

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

Том 21, № 6. С. 1009-1208

2019

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



XI Всероссийская школа по клинической иммунологии

«ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

2 – 8 февраля 2020 года

Пушкинские Горы, Псковская область

Организаторы:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Российская Академия Наук

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга
Администрация Псковской области

ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России

Институт экспериментальной медицины

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Российское научное общество иммунологов

Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов

Российское цитокиновое общество

Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»

Санкт-Петербургское региональное отделение Российской Ассоциации
Аллергологов и Клинических Иммунологов

В программе школы:

- Лекции ведущих российских иммунологов
- Лекции зарубежных специалистов
- Семинары по практическим вопросам иммунологии

Пакет слушателя включает:

- Посещение лекций и семинаров
- Проживание
- 3-разовое питание
- Трансфер Псков – Пушкинские Горы и обратно

Всем слушателям будут выданы удостоверения о тематическом усовершенствовании установленного образца и зарегистрированные на сайте НМО www.sovetnmo.ru получают 12 зачетных единиц (кредитов) по специальности: «аллергология и иммунология» или «клиническая лабораторная диагностика»

Координатор проекта:

Председатель Правления СПб РО РААКИ, академик РАН, Тотолян Арег Артемович

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

тел./факс: (812) 232-00-66

e-mail: totlin@spbraaci.ru

Заявки подавать до 31 декабря 2019 года.

Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна

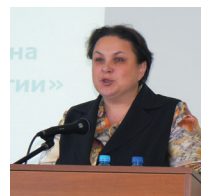
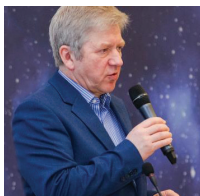
Тел./факс: (812) 233-08-58

e-mail: shkola@spbraaci.ru

Адрес для корреспонденции: 197136, Санкт-Петербург, а/я 58, СПб РО РААКИ

www.spbraaci.ru

www.allergologi-immunologi.ru



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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ноябрь-декабрь

2019, том 21

№ 6

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 26.12.2019 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 997

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 Флориды, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

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

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

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

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

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

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

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

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH
(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

November-December

2019, volume 21

No. 6

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

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

Address for correspondence:

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

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

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

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

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

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

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 26.12.2019. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

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

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

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

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

Editorial Council

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

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

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

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Еремеев В.В., Шепелькова Г.С., Эрешов А.Э.

НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ВАКЦИНАЦИИ ВСГ	1015
---	------

Оригинальные статьи

Просекова Е.В., Плехова Н.Г., Турянская А.И., Сабыныч В.А.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ХЕЛПЕРОВ 17 ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ У ДЕТЕЙ	1023
--	------

Жирков А.А., Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Монахова Н.Е., Бессонова Т.В.

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ С СИНДРОМОМ МЕНИНГИЗМА	1033
---	------

Давыдова Е.В., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Альтман Д.Ш.

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В МЕХАНИЗМАХ ИММУННОЙ ДИСРЕГУЛЯЦИИ И ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ	1043
--	------

Болотская Л.А., Тарлюн А.А.

ГОРМОНАЛЬНЫЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АУТОИММУННОГО ТИРЕОИДИТА У ЛИЦ В СЕМЬЯХ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ	1055
---	------

Биктагирова Э.М., Вагапова Г.Р., Семakov Г.П., Золотоверхова Н.И., Невзорова Т.А., Андрианова И.А., Евтюгина Н.Г., Акберова Н.И., Хисамутдинов А.Н., Абрамова З.И.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОМЕНА МАКРОТИРОТРОПИНИИ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ И СУБКЛИНИЧЕСКИМ ГИПОТИРЕОЗОМ	1063
---	------

Сизякина Л.П., Харитонова М.В.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ В1- И В2-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ СЕРОНЕГАТИВНОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ СУСТАВНОЙ ФОРМЫ	1073
--	------

Лазарева Н.М., Кудрявцев И.В., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Бажанов А.А., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тоголян Арег А.

АНАЛИЗ СУБПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ ПРИ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ АКТИВНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ	1081
---	------

Кнорин Б.Е., Давыдова Н.И., Аветисян А.О., Яблонский П.К.

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ И ИММУННЫЙ ОТВЕТ У БОЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫМ ФИБРОЗНО-КАВЕРНОЗНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ С РАЗЛИЧНОЙ РАСПРОСТРАНЕННОСТЬЮ ДЕСТРУКТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ	1099
--	------

Давлетова К.И., Михайлова Е.С., Вараксин Н.А., Жураковский И.П., Проскура А.В., Сидоров С.В., Аутеншлюс А.И.

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМОЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ ПРИ ЛИМФОГЕННОМ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ	1115
--	------

Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Долгова Д.Р., Антонеева И.И., Песков А.Б., Генинг С.О.

ФЕНОТИП ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ НЕОПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ	1127
---	------

Мягкова М.А., Боброва З.В., Петроченко С.Н.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ К НЕЙРОМЕДИАТОРАМ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА	1139
---	------

Ильичева Т.Н., Дурыманов А.Г., Иванова Е.В., Жирнов В.А., Епанчинцева А.В., Святченко С.В., Торжкова П.Ю., Буланович Ю.А., Рыжиков А.Б.

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ К ГРИППУ И ТЯЖЕЛЫЕ СЛУЧАИ ЗАБОЛЕВАНИЯ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2018-2019 гг.	1147
---	------

Краткие сообщения

Безрукова Е.В., Воробейчиков Е.В., Конусова В.Г., Симбирцев А.С.

ОЦЕНКА ТЯЖЕСТИ ХРОНИЧЕСКОГО ПОЛИПОЗНОГО РИНОСИНУСИТА НА ОСНОВЕ ИЗМЕНЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ IL-1 β И IL-1ra В НОСОВЫХ СЕКРЕТАХ	1155
--	------

Агарков Н.М., Чухраев А.М., Яблокова Н.В.

ДИАГНОСТИКА И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ ПО УРОВНЮ МЕСТНЫХ ЦИТОКИНОВ	1163
--	------

Логаткина А.В., Бондарь С.С., Терехов И.В., Никифоров В.С.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ И КОСТИМУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА	1169
--	------

Татаркова Е.А., Туеуз А.Р., Цикуниб А.А., Шумилов Д.С., Смольков И.В., Руденко К.А., Муженя Д.В.

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ IL-1 β (C511T), IL-17A (G197A), IL-12B (A1188C), TNF α (G308A) И IL-4 (C589T) ПРИ УГРОЗЕ РАННИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ	1179
---	------

Калюжин О.В., Летяева О.И., Зиганшин О.Р., Маркеева Д.А., Блохина Ю.В., Феденко Е.С., Попилук С.Ф.

КОМПОЗИЦИЯ ТРЕХ МУРАМИЛПЕПТИДОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В ИММУНОТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПИОДЕРМИИ	1187
--	------

Боклаженко Е.В., Бодиенкова Г.М., Русанова Д.В.

ОЦЕНКА ВЗАИМООТНОШЕНИЙ МЕЖДУ НЕЙРОТРОПНЫМИ АНТИТЕЛАМИ И ОТДЕЛЬНЫМИ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У ПАЦИЕНТОВ С ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ РТУТНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ В ПОСТКОНТАКТНОМ ПЕРИОДЕ	1197
---	------

Юбилей	1203
--------------	------

Правила для авторов	1205
---------------------------	------

Авторский указатель	1208
---------------------------	------

Предметный указатель	1208
----------------------------	------

CONTENTS

Reviews

Yermeev V.V., Shepelkova G.S., Ergeshov A.E.

A NON-SPECIFIC COMPONENT OF BCG VACCINATION.....	1015
--	------

Original articles

Prosekova E.V., Plekhova N.G., Turyanskaya A.I., Sabynych V.A.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE T HELPER 17 SUBPOPULATION IN ALLERGIC DISEASES OF THE RESPIRATORY ORGANS IN CHILDREN.....	1023
--	------

Zhirkov A.A., Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Monakhova N.E., Bessonova T.V.

SUBSETS OF CEREBROSPINAL FLUID LYMPHOCYTES IN ACUTE PEDIATRIC RESPIRATORY VIRAL INFECTION WITH MENINGEAL SYNDROME	1033
---	------

Davydova E.V., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Altman D.S.

ROLE OF LIPID METABOLIC DISTURBANCES FOR THE MECHANISMS OF IMMUNE DYSREGULATION AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY.....	1043
--	------

Bolotskaya L.A., Tarlyun A.A.

HORMONAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF AUTOIMMUNE TYROIDITIS IN PERSONS IN FAMILIES WITH AUTOIMMUNE DISEASES	1055
--	------

Biktagirova E.M., Vagapova G.R., Semakov G.P., Zolotoverkchova N.I., Nevzorova T.A., Andrianova I.A., Evtugina N.G., Akberova N.I., Khisamutdinov A.N., Abramova Z.I.

DETECTION OF MACRO-THYROTROPINAEMIA IN PATIENTS WITH HASHIMOTOS THYROIDITIS AND SUBCLINICAL HYPOTHYROIDISM	1063
--	------

Sizyagina L.P., Kharitonova M.V.

DYNAMICS OF CHANGES IN B1 AND B2 LYMPHOCYTE POPULATIONS IN ARTICULAR FORM OF SERONEGATIVE RHEUMATOID ARTHRITIS ...	1073
--	------

Lazareva N.M., Kudryavtsev I.V., Baranova O.P., Serebriakova M.K., Bazhanov A.A., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A.

PERIPHERAL BLOOD B CELL SUBSETS FROM PATIENTS WITH VARIOUS ACTIVITY OF CHRONIC SARCOIDOSIS	1081
--	------

Knoring B.E., Davydova N.I., Avetisyan A.O., Yablonsky P.K.

LYMPHOCYTE APOPTOSIS AND IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH DRUG-RESISTANT FIBRO-CAVERNOUS TUBERCULOSIS WITH DIFFERENT PREVALENCE OF DESTRUCTIVE CHANGES IN THE LUNGS	1099
---	------

Davletova K.I., Mikhaylova E.S., Varaksin N.A., Zhurakovskiy I.P., Proskura A.V., Sidorov S.V., Autenshlyus A.I.

CYTOKINES PRODUCTION BY BLOOD IMMUNE CELLS IN PATIENTS OF DIFFERENT AGE GROUPS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA OF NO SPECIAL TYPE AND LYMPHATIC METASTASES	1115
---	------

Abakumova T.V., Gening T.P., Dolgova D.R., Antoneeva I.I., Peskov A.B., Gening S.O.

PHENOTYPE OF CIRCULATING NEUTROPHILS AT DIFFERENT STAGES OF CERVICAL NEOPLASIA.....	1127
---	------

Myagkova M.A., Bobrova Z.V., Petrochenko S.N.

COMPARATIVE ANALYSIS OF NATURAL ANTIBODIES TO NEUROTRANSMITTERS DURING CHANGES OF PHYSICAL BODY BURDENS.....	1139
--	------

Silyicheva T.N., Durymanov A.G., Ivanova E.V., Zhimov V.A., Epanchintseva A.V., Svyatchenko S.V., Torzhkova P.Yu., Bulanovich Yu.A., Ryzhikov A.B.

HUMORAL IMMUNITY TO INFLUENZA AND SEVERE INFLUENZA CASES IN RUSSIA IN 2018-2019	1147
---	------

Short communications

Bezrukova E.V., Vorobeychikov E.V., Konusova V.G., Simbirtsev A.S.

SEVERITY EVALUATION OF CHRONIC POLYPOUS RHINOSINUSITIS BASED ON CHANGES OF IL-1 β CYTOKINE AND IL-1ra CONCENTRATIONS IN NASAL SECRETIONS.....	1155
---	------

Agarkov N.M., Chukhraev A.M., Yablokova N.V.

DIAGNOSIS AND PREDICTION OF PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA BY THE LEVEL OF LOCAL CYTOKINES.....	1163
--	------

Logatkina A.V., Terekhov I.V., Bondar S.S., Nikiforov V.S.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF SOLUBLE ADHESION MOLECULES AND COSTIMULATORY MOLECULES OF IMMUNE CELLS IN THE PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE	1169
---	------

Tatarkova E.A., Tuguz A.R., Tsikunib A.A., Shumilov D.S., Smolkov I.V., Rudenko K.A., Muzhenya D.V.

GENE POLYMORPHISMS OF IL-1 β (C511T), IL-17A (G197A), IL-12B (A1188C), TNF α (G308A) AND IL-4 (C589T) ASSOCIATED WITH THREAT OF EARLY REPRODUCTIVE LOSSES	1179
--	------

Kalyuzhin O.V., Letyaeva O.I., Ziganshin O.R., Markeeva D.A., Blokhina Yu.V., Fedenko E.S., Popilyuk S.F.

A COMBINATION OF THREE MURAMYL PEPTIDES DERIVED FROM GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN IMMUNOTHERAPY OF CHRONIC PYODERMIA.....	1187
--	------

Boklazhenko E.V., Bodienkova G.M., Rusanova D.V.

STUDIES OF INTERRELATIONS BETWEEN NEUROTROPHIC ANTIBODIES AND INDIVIDUAL NEUROPHYSIOLOGICAL INDICES IN PATIENTS WITH PROFESSIONAL CHRONIC MERCURY INTOXICATION AT THE POST-EXPOSURE PERIOD	1197
--	------

Anniversary	1203
-------------------	------

Instructions to Authors	1205
-------------------------------	------

Author index	1208
--------------------	------

Subject index.....	1208
--------------------	------

НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ВАКЦИНАЦИИ BCG

Еремеев В.В., Шепелькова Г.С., Эргешов А.Э.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Резюме. Десятилетия исследования механизмов иммунологической защиты от возбудителя туберкулеза (ТБ), *Mycobacterium tuberculosis*, не позволяют сделать окончательный вывод об относительной значимости конкретных путей формирования протективной иммунологической памяти. Единственная на сегодняшний день разрешенная к применению противотуберкулезная вакцина BCG защищает детей от тяжелых форм туберкулезной инфекции. До сих пор непонятно, почему BCG не спасает от первичного инфицирования, реактивации ТБ и латентного носительства. В то же время продемонстрирована связь вакцинации BCG со сниженным риском немикобактериальных инфекций, аллергий, онкологических заболеваний и общей смертности. Подобные неспецифические эффекты вакцинации BCG опосредованы скорее клетками врожденной иммунной системы, а не специфическими Т-клетками памяти. Имеются данные, указывающие на адьювантный эффект вакцинации BCG в отношении гуморального иммунного ответа на разнообразные вакцины в детском возрасте. Данный обзор посвящен преимущественно анализу работ, направленных на изучение относительно недавно выявленного механизма генерации неспецифического эффекта вакцины BCG — развитие наведенного врожденного иммунитета. Наведенный врожденный иммунный ответ опосредован сигналами, поступающими в клетку через внутриклеточный связывающий бактериальный мурамилдипептид-рецептор NOD2, и эпигенетической модификацией макрофагов и выражается в усиленной в результате вакцинации BCG способности макрофагов секретировать такие цитокины, как TNF α и IL-6, в ответ на стимуляцию неродственными BCG микроорганизмами или лигандами TLR. Наведенный иммунитет заключается не только в перенастройке передачи иммунологических сигналов между клетками врожденной иммунной системы, но также в индукции глубоких изменений баланса метаболических путей, таких как гликолиз, окислительное фосфорилирование, метаболизм аминокислот и жирных кислот, и сопровождается увеличением способности клеток врожденной иммунной системы отвечать на вторичную стимуляцию. Понимание этих внутриклеточных процессов открывает новые возможности терапевтического вмешательства в регуляцию иммунных процессов, сопровождающих инфекционные и воспалительные заболевания. В целом углубленное изучение неспецифического компонента вакцинации BCG должно привести к формированию новых представлений о механизмах ее защитного действия, а также повлиять на дизайн новой противотуберкулезной вакцины. Полученные при этом знания способны стимулировать изменения глобальной политики вакцинации с целью оптимизации преимуществ вакцинации для снижения детской заболеваемости и смертности и уменьшения риска развития поствакцинальных осложнений.

Ключевые слова: туберкулез, вакцинация, BCG, гуморальный иммунитет, неспецифический эффект, наведенный врожденный иммунитет

Адрес для переписки:

Еремеев Владимир Витальевич
ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский
институт туберкулеза»
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2.
Тел.: 8 (499) 785-91-59.
E-mail: yermeev56@mail.ru

Address for correspondence:

Yermeev Vladimir V.
Central Tuberculosis Research Institute
107564, Russian Federation, Moscow, Yauza all., 2.
Phone: 7 (499) 785-91-59.
E-mail: yermeev56@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Еремеев, Г.С. Шепелькова, А.Э. Эргешов
«Неспецифическая составляющая вакцинации BCG»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6.
С. 1015-1022.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1015-1022
© Еремеев В.В. и соавт., 2019

For citation:

V.V. Yermeev, G.S. Shepelkova, A.E. Ergeshov "A non-specific component of BCG vaccination", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1015-1022.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1015-1022
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1015-1022

A NON-SPECIFIC COMPONENT OF BCG VACCINATION

Yermeev V.V., Shepelkova G.S., Ergeshov A.E.

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract. Decades of research on the mechanisms of immunological protection against *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis (TB), did not allow us to draw a final conclusion about the relative importance of specific pathways when forming protective immunological memory. The BCG vaccine, being the only so far approved tuberculosis vaccine protects children from severe forms of TB infection. It is still unclear why BCG does not save from primary infection, reactivation of TB and latent carrying. At the same time, the association between BCG vaccination and a reduced risk of non-mycobacterial infections, allergies, cancer and general mortality has been demonstrated. Such nonspecific effects of BCG are dependent mostly on the innate immune cells, rather than on specific memory T cells. There is evidence of an adjuvant effect of BCG vaccination with respect to the humoral immune response to a variety of childhood vaccines. This review is focused mostly on the analysis of works aimed at studying the relatively recently identified mechanism for generating the non-specific effect of the BCG vaccine, i.e., development of induced natural immunity. This phenomenon is mediated by NOD2 signaling and epigenetic macrophage modification and, due to BCG vaccination, leads to enhanced capacity of macrophages to produce TNF α and IL-6 in response to stimulation by BCG-nonrelated microorganisms or TLR ligands. Induced immunity does not only reshape transmission of immunological signals between the cells of innate immune system, but also induces profound changes in the balance of metabolic pathways, such as glycolysis, oxidative phosphorylation, metabolism of amino acids and fatty acids, being accompanied by enhanced ability of innate immune cells to respond to the secondary stimulation. Realizing these intracellular processes opens up new opportunities for therapeutic intervention into the regulation of immune processes accompanying infectious and inflammatory diseases. In general, an in-depth study of the non-specific component of BCG vaccination should lead to emergence of new ideas about the mechanisms of its protective action, as well as affect development of a new TB vaccine. This knowledge can stimulate changes in global vaccination policy, aiming for optimization of vaccination benefits and reduction of childhood morbidity and mortality, as well as decrease of the post-vaccinal complications.

Keywords: tuberculosis, vaccination, BCG, humoral immunity, non-specific effect, induced innate immunity

Работа выполнена в рамках темы НИР 0515-2019-0018.

Введение

Относительный вклад врожденной и адаптивной ветвей иммунного ответа в формирование протективной иммунологической памяти и защиты от возбудителя туберкулеза (ТБ), *Mycobacterium tuberculosis*, остается дискуссионным несмотря на многолетнюю историю исследований. Используемая вот уже на протяжении почти 100 лет вакцина BCG защищает детей от тяжелых форм туберкулезной инфекции [51]. В то же время непонятно, почему BCG не спасает от первичного инфицирования, реактивации ТБ и латентного носительства. За последние годы был проведен ряд исследований, позволивших внести ясность в вопрос эффективности BCG в предупреждении всех вариантов ТБ, что нашло отражение в последней редакции рекомендаций ВОЗ [53]. Относительно недавно опубликованный мета-анализ клинических испытаний показал, что неонатальная вакцинация предупреждает развитие ТБ легких у новорожденных

(с эффективностью 59%) и у детей (74%) [1]. Более того, обсервационные исследования смогли проследить эффект неонатальной вакцинации на протяжении до 20 лет [35].

Гетерологические эффекты вакцинации BCG

Применение тестов, основанных на количественной оценке выделения IFN γ *in vitro* (так называемые IGRA-тесты), позволяет более точно, по сравнению с кожным тестом на туберкулин, выявлять инфицирование *M. tuberculosis* в вакцинированных BCG популяциях [7]. Проведенное относительно недавно рандомизированное контролируемое исследование у южноафриканских подростков без латентной ТБ и ВИЧ ко-инфекции показало, что ревакцинация BCG снижает двухлетний риск инфицирования *M. tuberculosis* с 11,6 до 6,7% [39]. В этом же исследовании было сделано любопытное наблюдение о снижении частоты инфекций верхних дыхательных путей у ревакцинированных BCG подростков. Данное наблюдение дополняет целый ряд других обсервационных исследований, в которых была продемонстрирована связь вакцинации BCG со сниженным риском немикобакте-

риальных инфекций, аллергий, онкологических заболеваний и общей смертности [38, 46, 50]. Подобные неспецифические эффекты вакцинации BCG обусловлены, скорее, клетками врожденной иммунной системы, а не специфическими Т-клетками памяти.

Влияние вакцинации BCG на неспецифический гуморальный иммунитет

Имеются данные, указывающие на адьювантный эффект вакцинации BCG в отношении гуморального иммунного ответа на разнообразные вакцины в детском возрасте. Так, например, в группе вакцинированных BCG в роддоме детей отмечались более высокие титры специфических IgG-антител в ответ на вакцинацию против гепатита В [42]. Более того, одновременное введение BCG и пероральной вакцины против полиомиелита усиливает антительный ответ на антигены вируса [42], что указывает на системный эффект BCG на иммунный ответ хозяина. Проведенное в Австралии сравнение группы из 56 вакцинированных BCG детей с группой из 52 не вакцинированных BCG детей выявило более высокие титры антител к антигенам капсулярного полисахарида пневмококка, полисахарида типа b *H. influenzae* и токсину столбняка в группе вакцинированных BCG после соответствующих возрастных вакцинаций [44].

Согласно гигиенической гипотезе, наблюдаемое в последние десятилетия возрастание распространенности аллергических заболеваний в развитых странах может быть связано со снижением количества микробных инфекций, включая ТБ, которые обычно сдвигают реактивность иммунной системы в направлении ответа по типу Th1. В результате нарушение баланса Th1/Th2 в пользу Th2 способствует синтезу антител класса IgE и стимулирует развитие аллергической реактивности [49]. Соответственно, вакцинация BCG на раннем этапе жизни, подобно микобактериальной инфекции, способна снижать частоту atopических проявлений. Ретроспективное исследование 800 японских школьников выявило ассоциацию положительного туберкулинового теста со сниженным уровнем IgE в сыворотке крови, сдвигом цитокинового профиля в направлении Th1 и снижением распространения астмы [47]. У итальянских добровольных доноров с аллергическим ринитом было отмечено существенное снижение специфичных к аллергену IgE-антител после вакцинации [13]. Еще в одном исследовании была обнаружена ассоциация вакцинации BCG со спонтанной и стимулированной секрецией IgE *in vitro* лимфоцитами периферической крови страдающих астмой детей [8]. Опубликован ряд доклинических наблюдений, устанавливающих ассоциацию вакцинации BCG

со снижением содержания специфичных к аллергену антител и благотворным воздействием на atopические нарушения [17, 33].

Имеются, однако, и прямо противоположные данные, свидетельствующие об отсутствии влияния вакцинации BCG на уровни IgE и развитие atopических проявлений [12, 19, 20]. Различия полученных результатов могут объясняться различным возрастом вакцинируемых или временем, прошедшим между вакцинацией и исследованием [41, 55], либо генетическими факторами [2].

Механизмы неспецифического эффекта вакцины BCG

Наведенный врожденный иммунитет

О взаимодействии BCG с рецепторами клеток врожденного иммунного ответа, такими, например, как TLR2 и TLR4, известно уже достаточно давно [40]. Относительно недавно появились данные о способности BCG запускать процесс формирования клеток памяти из компонентов врожденного иммунитета, создавая так называемый «BCG-наведенный» врожденный иммунитет [34]. Это явление опосредовано сигналами, поступающими в клетку через рецептор NOD2, и эпигенетической модификацией макрофагов и выражается в усиленной в результате вакцинации BCG способности макрофагов секретировать TNF α и IL-6 в ответ на стимуляцию неродственными BCG микроорганизмами или лигандами TLR. Наведенный врожденный иммунный ответ наблюдался также при изучении естественных клеток-киллеров (NK) человека и мыши [28]. Вакцинация BCG приводит к изменениям в метаболизме клеток врожденного звена иммунной системы: происходит сдвиг от окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу [14]. Инактивированная облучением BCG менее эффективно, чем живая культура, «иммунизирует» моноциты [3]. Развитием «BCG-наведенного» врожденного иммунного ответа, по-видимому, объясняется усиление реакций врожденного звена иммунитета на неспецифическую стимуляцию в группах, вакцинированных BCG детей в Западной Африке [25] и Великобритании [48]. В экспериментах на животных показано, что проникновение BCG в костный мозг ведет к усилению миелопоэза за счет относительного снижения лимфопоэза [27]. При этом после контакта гематopoэтических стволовых клеток с BCG из них развивались эпигенетически модифицированные макрофаги, способные более эффективно бороться с туберкулезной инфекцией по сравнению с наивными макрофагами [27]. Относительно недавно было показано, что основной путь формирования «BCG-наведенного» врожденного иммунного ответа связан с регули-

руемыми системой Akt-mTOR гликолизом и метаболизмом глутамина [4]. При этом первичная стимуляция BCG приводит к эпигенетическому перепрограммированию наивных клеток врожденного иммунитета и формированию из них подобия клеток памяти. Эпигенетические изменения связаны с регуляцией продукции цитокинов и клеточного метаболизма и, в свою очередь, зависят от этих факторов, образуя петлю обратной связи [37].

Существование петли обратной связи между наведенным BCG врожденным иммунитетом и последующими метаболическими изменениями находит все больше экспериментальных подтверждений. Известно, что активация реакций гликолиза ведет к накоплению таких субстратов цикла Кребса, как фумарат и сукцинат. Эти метаболиты способствуют стабилизации HIF-1 α (индуцируемый гипоксией фактор 1 α) – фактора транскрипции, расположенного после Akt/mTOR на пути передачи сигнала, активирующего экспрессию генов гликолиза и IL-1 β [9]. Было показано также, что фумарат участвует в ингибции деметилазы гистонов KDM5 [6]. Совместно эти два наблюдения позволяют предположить, что сдвиг метаболического равновесия в сторону гликолиза увеличивает пропорцию некоторых метаболитов, которые, в свою очередь, поставляют необходимые химические группы модифицирующим хроматин ферментам, и тем самым запускает эпигенетические модификации, ассоциированные с наведенным естественным иммунитетом. Аналогичным образом подавление гликолиза ведет к нарушениям естественного иммунитета, индуцированного BCG либо другими стимуляторами, например β -глюканами. К тому же усиление гликолиза стимулирует липогенез, в частности биосинтез холестерина, где промежуточным метаболитом является мевалонат. Ключевая роль мевалоната в формировании индуцированного BCG естественного иммунитета была продемонстрирована в эксперименте *in vitro*, когда подавление биосинтеза мевалоната в моноцитах статинами привело к нарушению формирования иммунных макрофагов [22]. В ближайшие годы, по мере установления причинно-следственных связей и конкретизирования знаний о межклеточных взаимодействиях, будет развиваться наше понимание роли иммунометаболизма в формировании наведенного естественного иммунитета.

В моделях *in vitro* была продемонстрирована существенная роль аутофагии в формировании наведенного BCG естественного иммунитета. Независимо была установлена необходимость сигнала от молекулярных паттернов патогена (PAMPs) через рецептор NOD2 [29]. Аутофа-

госомы способствуют процессированию муромилдипептида BCG, распознаванию его внутриклеточным рецептором NOD2 и запуску каскада эпигенетических изменений, например H3K4me3, приводящих к усилению экспрессии провоспалительных генов [10].

В исследованиях последних лет была продемонстрирована способность BCG влиять на процессы ранних стадий миелопоэза, инструктируя гематopoэтические стволовые клетки-предшественники костного мозга к развитию в моноциты и макрофаги со специфической эпигенетической программой. Таким образом, неспецифический эффект вакцинации может быть связан с изменением функционала зрелых клеток миелоидного происхождения в периферических органах [27, 36]. Моноциты человека и теленка сохраняют «наведенный» фенотип на протяжении от 3 до 12 месяцев после вакцинации BCG [23, 30], в то время как обычный срок жизни циркулирующих моноцитов не превышает 1-2 дней.

В рандомизированном исследовании на добровольцах было показано, что, в отличие от плацебо, вакцинация BCG индуцирует эпигенетическое репрограммирование моноцитов *in vivo* и защищает от экспериментального заражения атenuированным вакцинным штаммом вируса желтой лихорадки. Эпигенетическое репрограммирование моноцитов сопровождалось их функциональными изменениями, характерными для формирования наведенного естественного иммунного ответа. Снижению виремии сопутствовало нарастание содержания IL-1 β при отсутствии корреляции со специфическим ответом по типу IFN γ [5].

Наведенный иммунитет заключается не только в перенастройке передачи иммунологических сигналов между клетками врожденной иммунной системы, но также в индукции глубоких изменений баланса метаболических путей, таких как гликолиз, окислительное фосфорилирование, метаболизм аминокислот и жирных кислот, и сопровождается увеличением способности клеток врожденной иммунной системы отвечать на вторичную стимуляцию. Понимание этих внутриклеточных процессов открывает новые возможности терапевтического вмешательства в регуляцию иммунных процессов, сопровождающих инфекционные и воспалительные заболевания [18].

Усиление реакций врожденной иммунной системы наблюдалось у вакцинированных BCG новорожденных [21]; в то же время способность к развитию наведенного естественного иммунитета распределена в популяции неравномерно, у некоторых макрофаги моноцитарного происхождения после вакцинации BCG способны

ограничивать рост *M. tuberculosis*, у других — нет. В группе лиц с более выраженным вакцинным эффектом BCG отмечались определенные изменения метилирования ДНК генов, задействованных в иммунном ответе, по сравнению с теми, чьи макрофаги менее эффективно ограничивали рост *M. tuberculosis* [52]. Идентификация механизмов формирования наведенного естественного иммунного ответа будет способствовать созданию вакцин с более широким спектром действия.

Анализ ряда обсервационных исследований и недавнего рандомизированного испытания показал, что на счет активации врожденного иммунитета в результате вакцинации BCG можно отнести до 50% создаваемой вакциной защиты от инфицирования *M. tuberculosis*. Молекулярные механизмы, ответственные за раннюю элиминацию микобактерий, изучены еще недостаточно, но можно предположить их связь с наведенным врожденным иммунитетом [31].

В контролируемом рандомизированном испытании на 20 здоровых добровольцах было изучено влияние вакцинации BCG на развитие иммунитета и течение контролируемого заражения человека малярией. В группе вакцинированных BCG наблюдалось более раннее и выраженное развитие клинических симптомов заражения на фоне существенно более раннего появления маркеров активации NK-клеток и моноцитов [53].

BCG часто применяют для местной иммунотерапии рака мочевого пузыря [32]. Относительно недавно было показано, что противораковый эффект BCG связан с наведенным врожденным иммунитетом [11]. Установлено, что стимулированные введением BCG клетки врожденной иммунной системы оказывают неспецифическое цитотоксическое воздействие на клетки опухоли. В результате происходит активация опухолеспецифичного Т-клеточного ответа, поскольку после успешной BCG-терапии в моче больных выявляются значительные количества Т-лимфоцитов, специфичных к антигенам опухоли [43]. Таким образом, наведенный врожденный иммунитет открывает возможности для использования бактериальных антигенов для терапии неинфекци-

онных заболеваний. Собственно, иммунотерапия рака начиналась пионерскими работами William Coley по введению бактериальных компонентов онкологическим больным [15, 16].

Заключение.

В заключение хотелось бы отметить, что вакцина BCG до сих пор остается единственной принятой противотуберкулезной вакциной. В случае появления новой, более эффективной вакцины против ТБ важным фактором будет ее способность оказывать неспецифическое, подобное BCG воздействие, а также решение вопроса о продолжении применения BCG в связи с ее влиянием на снижение младенческой смертности. Схема прививок должна быть организована таким образом, чтобы добиться максимального положительного эффекта, как специфического, так и неспецифического. Примером могут служить противоречивые результаты ряда обсервационных исследований неспецифического эффекта вакцинации комплексной вакциной против коклюша дифтерии и столбняка (АКДС). Одни группы исследователей наблюдали благоприятные неспецифические эффекты, в то время как другие отмечали возросшую частоту ротавирусных инфекций в когорте получавших АКДС девочек [24, 45]. Несмотря на то, что комиссия ВОЗ посчитала эти данные недостаточными для изменения рекомендованной схемы вакцинации (введение АКДС после BCG), результаты, полученные в Бангладеш, Индии и Сенегале, указывают на целесообразность одновременного введения этих вакцин для уменьшения побочных эффектов и снижения смертности [25].

В целом углубленное изучение неспецифического компонента вакцинации BCG должно привести к формированию новых представлений о механизмах ее защитного действия, а также повлиять на дизайн новой противотуберкулезной вакцины. Полученные при этом знания способны стимулировать изменения глобальной политики вакцинации с целью оптимизации преимуществ вакцинации для снижения детской заболеваемости и смертности.

Список литературы / References

1. Abubakar I., Pimpin L., Ariti C., Beynon R., Mangtani P., Sterne J.A., Fine P.E., Smith P.G., Lipman M., Elliman D., Watson J.M., Drumright L.N., Whiting P.F., Vynnycky E., Rodrigues L.C. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette–Guerin vaccination against tuberculosis. *Health Technol. Assess.*, 2013, Vol. 17, no. 37, pp. 1–372.
2. Alm J.S., Sanjeevi C.B., Miller E.N., Dabadghao P., Lilja G., Pershagen G., Blackwell J.M., Scheynius A. Atopy in children in relation to BCG vaccination and genetic polymorphisms at SLC11A1 (formerly NRAMP1) and D2S1471. *Genes Immun.*, 2002, Vol. 3, no. 2, pp. 71–77.
3. Arts R.J.W., Blok B.A., Aaby P., Joosten L.A., de Jong D., van der Meer J.W., Benn C.S., van Crevel R., Netea M.G. Long-term *in vitro* and *in vivo* effects of γ -irradiated BCG on innate and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 98, no. 6, pp. 995–1001.

4. Arts R.J.W., Carvalho A., la Rocca C., Palma C., Rodrigues F., Silvestre R., Kleinnijenhuis J., Lachmandas E., Gonçalves L.G., Belinha A., Cunha C., Oosting M., Joosten L.A.B., Matarese G., van Crevel R., Netea M.G. Immunometabolic pathways in BCG-induced trained immunity. *Cell Rep.*, 2016, Vol. 17, no. 10, pp. 2562-2571.
5. Arts R.J.W., Moorlag S.J.C.F.M., Novakovic B., Li Y., Wang S.Y., Oosting M., Kumar V., Xavier R.J., Wijmenga C., Joosten L.A.B., Reusken C.B.E.M., Benn C.S., Aaby P., Koopmans M.P., Stunnenberg H.G., van Crevel R., Netea M.G. BCG Vaccination protects against experimental viral infection in humans through the induction of cytokines associated with trained immunity. *Cell Host Microbe*, 2018, Vol. 23, no. 1, pp. 89-100.e5.
6. Arts R.J.W., Novakovic B., ter Horst R., Carvalho A., Bekkering S., Lachmandas E., Rodrigues F., Silvestre R., Cheng S.C., Wang S.Y., Habibi E., Gonçalves L.G., Mesquita I., Cunha C., van Laarhoven A., van de Veerdonk F.L., Williams D.L., van der Meer J.W., Logie C., O'Neill L.A., Dinarello C.A., Riksen N.P., van Crevel R., Clish C., Notebaart R.A., Joosten L.A., Stunnenberg H.G., Xavier R.J., Netea M.G. Glutaminolysis and fumarate accumulation integrate immunometabolic and epigenetic programs in trained immunity. *Cell Metab.*, 2016, Vol. 24, no. 6, pp. 807-819.
7. Auguste P., Tsertsvadze A., Pink J., Court R., McCarthy N., Sutcliffe P., Clarke A. Comparing interferon-gamma release assays with tuberculin skin test for identifying latent tuberculosis infection that progresses to active tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.*, 2017, Vol. 17, no. 1, p. 200.
8. Barlan I.B., Tükenmez F., Bahçeciler N.N., Başaran M.M. The impact of *in vivo* Calmette–Guerin Bacillus administration on *in vitro* IgE secretion in atopic children. *J. Asthma*, 2002, Vol. 39, no. 3, pp. 239-246.
9. Bekkering S., Arts R.J.W., Novakovic B., Kourtzelis I., van der Heijden C.D.C.C., Li Y., Popa C.D., ter Horst R., van Tuijl J., Netea-Maier R.T., van de Veerdonk F.L., Chavakis T., Joosten L.A.B., van der Meer J.W.M., Stunnenberg H., Riksen N.P., Netea M.G. Metabolic induction of trained immunity through the mevalonate pathway. *Cell*, 2018, Vol. 172, no. 1-2, pp. 135-146.e9.
10. Blok B.A., Arts R.J.W., van Crevel R., Benn C.S., Netea M.G. Trained innate immunity as underlying mechanism for the long-term, nonspecific effects of vaccines. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 98, no. 3, pp. 347-356.
11. Buffen K., Oosting M., Quintin J., Ng A., Kleinnijenhuis J., Kumar V., van de Vosse E., Wijmenga C., van Crevel R., Oosterwijk E., Grotenhuis A.J., Vermeulen S.H., Kiemeny L.A., van de Veerdonk F.L., Chamilos G., Xavier R., van der Meer J.W., Netea M.G., Joosten L.A. Autophagy controls BCG-induced trained immunity and the response to intravesical BCG therapy for bladder cancer. Deretic V, ed. *PLoS Pathog.*, 2014, Vol. 10, no. 10, e1004485. doi: 10.1371/journal.ppat.1004485.
12. Byrne A.L., Marais B.J., Mitnick C.D., Garden F.L., Lecca L., Contreras C., Yauri Y., Garcia F., Marks G.B. Asthma and atopy prevalence are not reduced among former tuberculosis patients compared with controls in Lima, Peru. *BMC Pulm. Med.*, 2019, Vol. 19, no. 1, p. 40.
13. Cavallo G.P., Elia M., Giordano D., Baldi C., Cammarota R. Decrease of specific and total IgE levels in allergic patients after BCG vaccination: preliminary report. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2002, Vol. 128, no. 9, pp. 1058-1060.
14. Cheng S.-C., Quintin J., Cramer R.A., Shepardson K.M., Saeed S., Kumar V., Giamarellos-Bourboulis E.J., Martens J.H., Rao A., Aghajani-Refah A., Manjeri G.R., Li Y., Ifrim D.C., Arts R.J., van der Veer B.M., Deen P.M., Logie C., O'Neill L.A., Willems P., van de Veerdonk F.L., van der Meer J.W., Ng A., Joosten L.A., Wijmenga C., Stunnenberg H.G., Xavier R.J., Netea M.G. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 2014, Vol. 345, no. 6204, 1250684. doi: 10.1126/science.1250684.
15. Coley W.B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1991, Vol. 262, pp. 3-11.
16. Coley W.B. Treatment of inoperable malignant tumors with the toxins of erysipelas and the bacillus prodigiosus. *Am. J. Med. Sci.*, 1894, Vol. 108, ed. 1. Accessed September 18, 2019. Available at: <http://search.proquest.com/openview/2b4fb5bca8b11309314814797b826375/1?pq-origsite=gscholar&cbl=41361>.
17. Deng Y., Li W., Luo Y., Wang L.J., Xie X.H., Luo J., Luo Z.X., Zhao X.D., Fu Z., Liu E.M. Inhibition of IFN- γ promotes anti-asthma effect of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guerin neonatal vaccination: a murine asthma model. *Vaccine*, 2014, Vol. 32, no. 18, pp. 2070-2078.
18. Domínguez-Andrés J., Joosten L.A., Netea M.G. Induction of innate immune memory: the role of cellular metabolism. *Curr. Opin. Immunol.*, 2019, Vol. 56, pp. 10-16.
19. Eifan A.O., Akkoc T., Ozdemir C., Bahçeciler N.N., Barlan I.B. No association between tuberculin skin test and atopy in a bacillus Calmette–Guérin vaccinated birth cohort. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2009, Vol. 20, no. 6, pp. 545-550.
20. El-Zein M., Conus F., Benedetti A., Menzies D., Parent M.-E., Rousseau M.-C. Association between bacillus Calmette–Guérin vaccination and childhood asthma in the Quebec birth cohort on immunity and health. *Am. J. Epidemiol.*, 2017, Vol. 186, no. 3, pp. 344-355.
21. Freyne B., Donath S., Germano S., Gardiner K., Casalaz D., Robins-Browne R.M., Amenyogbe N., Messina N.L., Netea M.G., Flanagan K.L., Kollmann T., Curtis N. Neonatal BCG vaccination influences cytokine responses to toll-like receptor ligands and heterologous antigens. *J. Infect. Dis.*, 2018, Vol. 217, no. 11, pp. 1798-1808.
22. Gruenbacher G., Thurnher M. Mevalonate metabolism in cancer stemness and trained immunity. *Front. Oncol.*, 2018, Vol. 8, p. 394.

23. Guerra-Maupome M., Vang D.X., McGill J.L. Aerosol vaccination with Bacille Calmette-Guerin induces a trained innate immune phenotype in calves. *PLoS ONE*, 2019, Vol. 14, no. 2, e0212751. doi:10.1371/journal.pone.0212751.
24. Higgins J.P.T., Soares-Weiser K., López-López J.A., Kakourou A., Chaplin K., Christensen H., Martin N.K., Sterne J.A., Reingold A.L. Association of BCG, DTP, and measles containing vaccines with childhood mortality: systematic review. *BMJ*, 2016, Vol. 355, i5170. doi:10.1136/bmj.i5170.
25. Hirve S., Bavdekar A., Juvekar S., Benn C.S., Nielsen J., Aaby P. Non-specific and sex-differential effects of vaccinations on child survival in rural western India. *Vaccine*, 2012, Vol. 30, no. 50, pp. 7300-7308.
26. Jensen K.J., Larsen N., Biering-Sørensen S., Andersen A., Eriksen H.B., Monteiro I., Hougaard D., Aaby P., Netea M.G., Flanagan K.L., Benn C.S. Heterologous immunological effects of early BCG vaccination in low-birth-weight infants in Guinea-Bissau: a randomized-controlled trial. *J. Infect. Dis.*, 2015, Vol. 211, no. 6, pp. 956-967.
27. Kaufmann E., Sanz J., Dunn J.L., Khan N., Mendonça L.E., Pacis A., Tzelepis F., Pernet E., Dumaine A., Grenier J.C., Mailhot-Léonard F., Ahmed E., Belle J., Besla R., Mazer B., King I.L., Nijnik A., Robbins C.S., Barreiro L.B., Divangahi M. BCG educates hematopoietic stem cells to generate protective innate immunity against tuberculosis. *Cell*, 2018, Vol. 172, no. 1-2, pp. 176-190.e19.
28. Kleinnijenhuis J., Quintin J., Preijers F., Joosten L.A., Jacobs C., Xavier R.J., van der Meer J.W., van Crevel R., Netea M.G. BCG-induced trained immunity in NK cells: Role for non-specific protection to infection. *Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 155, no. 2, pp. 213-219.
29. Kleinnijenhuis J., Quintin J., Preijers F., Joosten L.A., Ifrim D.C., Saeed S., Jacobs C., van Loenhout J., de Jong D., Stunnenberg H.G., Xavier R.J., van der Meer J.W., van Crevel R., Netea M.G. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 43, pp. 17537-17542.
30. Kleinnijenhuis J., Quintin J., Preijers F., Benn C.S., Joosten L.A., Jacobs C., van Loenhout J., Xavier R.J., Aaby P., van der Meer J.W., van Crevel R., Netea M.G. Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *J. Innate Immun.*, 2014, Vol. 6, no. 2, pp. 152-158.
31. Koeken V.A.C.M., Verrall A.J., Netea M.G., Hill P.C., van Crevel R. Trained innate immunity and resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2019, Vol. 25, no. 12, pp. 1468-1472.
32. Kawai K., Miyazaki J., Joraku A., Nishiyama H., Akaza H. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: Current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. *Cancer Sci.*, 2013, Vol. 104, no. 1, pp. 22-27.
33. Ke X., Huang J., Chen Q., Hong S., Zhu D. Protective effects of combined *Mycobacterium bovis* BCG and interleukin-12 vaccination on airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Clin. Invest. Med.*, 2010, Vol. 33, no. 3, pp. E196-202.
34. Levy O., Wynn J.L. A prime time for trained immunity: innate immune memory in newborns and infants. *Neonatology*, 2014, Vol. 105, no. 2, pp. 136-141.
35. Mangtani P., Nguipod-Djompo P., Keogh R.H., Trinder L., Smith P.G., Fine P.E., Sterne J., Abubakar I., Vynnycky E., Watson J., Elliman D., Lipman M., Rodrigues L.C. Observational study to estimate the changes in the effectiveness of bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination with time since vaccination for preventing tuberculosis in the UK. *Health Technol. Assess.*, 2017, Vol. 21, no. 39, pp. 1-54.
36. Mitroulis I., Ruppova K., Wang B., Chen L.S., Grzybek M., Grinenko T., Eugster A., Troullinaki M., Palladini A., Kourtzelis I., Chatzigeorgiou A., Schlitzer A., Beyer M., Joosten L.A.B., Isermann B., Lesche M., Petzold A., Simons K., Henry I., Dahl A., Schultze J.L., Wielockx B., Zamboni N., Mirtschink P., Coskun Ü., Hajishengallis G., Netea M.G., Chavakis T. Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity. *Cell*, 2018, Vol. 172, no. 1-2, pp. 147-161.e12.
37. Moliva J.I., Turner J., Torrelles J.B. Immune responses to bacillus Calmette-Guérin vaccination: why do they fail to protect against *Mycobacterium tuberculosis*? *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, p. 407.
38. Moulton L.H., Rahmathullah L., Halsey N.A., Thulasiraj R.D., Katz J., Tielsch J.M. Evaluation of non-specific effects of infant immunizations on early infant mortality in a southern Indian population. *Trop. Med. Int. Health*, 2005, Vol. 10, no. 10, pp. 947-955.
39. Nemes E., Geldenhuys H., Rozot V., Rutkowski K.T., Ratangee F., Bilek N., Mabwe S., Makhethle L., Erasmus M., Toefy A., Mulenga H., Hanekom W.A., Self S.G., Bekker L.G., Ryall R., Gurunathan S., DiazGranados C.A., Andersen P., Kromann I., Evans T., Ellis R.D., Landry B., Hokey D.A., Hopkins R., Ginsberg A.M., Scriba T.J., Hatherill M.; C-040-404 Study Team. Prevention of *M. tuberculosis* infection with H4:IC31 vaccine or BCG revaccination. *N. Engl. J. Med.*, 2018, Vol. 379, no. 2, pp. 138-149.
40. Nicolle D., Fremont C., Pichon X., Bouchot A., Maillet I., Ryffel B., Quesniaux V.J. Long-term control of *Mycobacterium bovis* BCG infection in the absence of Toll-like receptors (TLRs): Investigation of TLR2-, TLR6-, or TLR2-TLR4-deficient mice. *Infect. Immun.*, 2004, Vol. 72, no. 12, pp. 6994-7004.
41. Omenaas E., Jentoft H.F., Vollmer W.M., Buist A.S., Gulsvik A. Absence of relationship between tuberculin reactivity and atopy in BCG vaccinated young adults. *Thorax*, 2000, Vol. 55, no. 6, pp. 454-458.
42. Ota M.O.C., Vekemans J., Schlegel-Haueter S.E., Fielding K., Sanneh M., Kidd M., Newport M.J., Aaby P., Whittle H., Lambert P.H., McAdam K.P., Siegrist C.A., Marchant A. Influence of *Mycobacterium bovis* bacillus

Calmette-Guérin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 2, pp. 919-925.

43. Pieraerts C., Martin V., Jichlinski P., Nardelli-Haeffliger D., Derre L. Detection of functional antigen-specific T cells from urine of non-muscle invasive bladder cancer patients. *Oncoimmunology*, 2012, Vol. 1, no. 5, pp. 694-698.

44. Ritz N., Mui M., Balloch A., Curtis N. Non-specific effect of Bacille Calmette-Guérin vaccine on the immune response to routine immunisations. *Vaccine*, 2013, Vol. 31, no. 30, pp. 3098-3103.

45. Rodrigues A., Fischer T.K., Valentiner-Branth P., Nielsen J., Steinsland H., Perch M., Garly M.L., Mølbak K., Aaby P. Community cohort study of rotavirus and other enteropathogens: are routine vaccinations associated with sex-differential incidence rates? *Vaccine*, 2006, Vol. 24, no. 22, pp. 4737-4746.

46. Rousseau M.-C., Parent M.-E., St-Pierre Y. Potential health effects from non-specific stimulation of the immune function in early age: the example of BCG vaccination. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2008, Vol. 19, no. 5, pp. 438-448.

47. Shirakawa T., Enomoto T., Shimazu S., Hopkin J.M. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science*, 1997, Vol. 275, no. 5296, pp. 77-79.

48. Smith S.G., Kleinnijenhuis J., Netea M.G., Dockrell H.M. Whole blood profiling of bacillus Calmette-Guérin-induced trained innate immunity in infants identifies epidermal growth factor, IL-6, platelet-derived growth factor-AB/BB, and natural killer cell activation. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, p. 644.

49. Strachan D.P. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax*, 2000, Vol. 55, Suppl. 1, pp. S2-10.

50. Sylvester R.J., van der Meijden A.P.M., Lamm D.L. Intravesical bacillus Calmette-Guérin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J. Urol.*, 2002, Vol. 168, no. 5, pp. 1964-1970.

51. Trunz B.B., Fine P., Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet*, 2006, Vol. 367, no. 9517, pp. 1173-1180.

52. Verma D., Parasa V.R., Raffetseder J., Martis M., Mehta R.B., Netea M., Lerm M. Anti-mycobacterial activity correlates with altered DNA methylation pattern in immune cells from BCG-vaccinated subjects. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 12305. doi: 10.1038/s41598-017-12110-2.

53. Walk J., de Bree L.C.J., Graumans W., Stoter R., van Gemert G.J., van de Vegte-Bolmer M., Teelen K., Hermesen C.C., Arts R.J.W., Behet M.C., Keramati F., Moorlag S.J.C.F.M., Yang A.S.P., van Crevel R., Aaby P., de Mast Q., van der Ven A.J.A.M., Stabell Benn C., Netea M.G., Sauerwein R.W. Outcomes of controlled human malaria infection after BCG vaccination. *Nat. Commun.*, 2019, Vol. 10, no. 1, p. 874.

54. World Health Organization. BCG vaccine: WHO position paper, February 2018 – Recommendations. *Vaccine*, 2018, Vol. 36, no. 24, pp. 3408-3410.

55. Yoneyama H., Suzuki M., Fujii K., Odajima Y. The effect of DPT and BCG vaccinations on atopic disorders. *Arerugi*, 2000, Vol. 49, no. 7, pp. 585-592.

Авторы:

Еремеев В.В. — д.м.н., заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Шепелькова Г.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Эргешов А.Э. — д.м.н., профессор, директор ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Authors:

Yeremeev V.V., PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Research, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Shepelkova G.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory for Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Ergeshov A.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Поступила 07.10.2019

Отправлена на доработку 20.11.2019

Принята к печати 28.11.2019

Received 07.10.2019

Revision received 20.11.2019

Accepted 28.11.2019

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ХЕЛПЕРОВ 17 ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ У ДЕТЕЙ

Просекова Е.В., Плехова Н.Г., Турянская А.И., Сабыныч В.А.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Резюме. Фенотипы бронхиальной астмы и аллергического ринита разделяются в зависимости от преобладающего направления иммунного ответа по профилю Т-лимфоцитов и спектру цитокинов, регулирующих субпопуляции Т-лимфоцитов хелперов. Актуальными являются исследования патогенетических механизмов различных фенотипов аллергических заболеваний дыхательных путей и оценка структурно-функциональных характеристик Th17-лимфоцитов и интерлейкина-17.

Цель исследования — провести анализ субпопуляций Th17-лимфоцитов и интерлейкинов-17A, 17F при atopической бронхиальной астме и аллергическом рините у детей.

Проведена комплексная оценка структурно-функциональных характеристик Т-хелперов 17 у 60 детей в возрасте 3-11 лет с верифицированным диагнозом «атопическая бронхиальная астма» (у 44 (73,33%) детей БА сочеталась с аллергическим ринитом) и 30 здоровых сверстников, составивших группу контроля. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD19, CD45RA, CD45RO и CD196. Для определения внутриклеточного содержания IL-17 использовали моноклональные антитела против IL-17A (клон REA1063), меченные PE-Vio770, изотипический контроль антитела против REA (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Методом твердофазного иммуноферментного анализа в сыворотке крови определяли содержание общего, специфического IgE и интерлейкинов-17A и 17F. Статистическую обработку результатов проводили с использованием прикладных программ Statistica 10.

Исследования функциональных и количественных характеристик иммунокомпетентных клеток у детей с atopической бронхиальной астмой и аллергическим ринитом выявили вариативность относительного и абсолютного количества субпопуляций CD3⁺CD4⁺CD8⁺, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺ и CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови без значимых различий по отношению к показателям для здоровых сверстников ($p < 0,001$). Значимое повышение количества Т-лимфоцитов у детей с atopической бронхиальной астмой было обнаружено в отношении субпопуляции CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ ($p < 0,001$), дифференцированной популяции CD3CD4⁺ позитивных Т-хелперов ($p < 0,05$) и субпопуляции Th-эффекторов, экспрессирующих обе изоформы рецептора CD45RA и CD45RO ($p < 0,01$). У детей с сочетанием atopической бронхиальной астмой и аллергического ринита удельный вес CD4CD45RO-позитивных клеток памяти был ниже ($p < 0,001$), а количество CD8⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, напротив, выше ($p < 0,025$), чем в группе здоровых сверстников.

Адрес для переписки:

Плехова Наталья Геннадьевна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.
Тел./факс: 8 (423) 242-97-78.
E-mail: pl_nat@hotmail.com

Address for correspondence:

Plekhova Natalia G.
Pacific State Medical University
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakov ave., 2.
Phone/Fax: 7 (423) 242-97-78.
E-mail: pl_nat@hotmail.com

Образец цитирования:

Е.В. Просекова, Н.Г. Плехова, А.И. Турянская, В.А. Сабыныч «Структурно-функциональная характеристика субпопуляции Т-хелперов 17 при аллергических заболеваниях органов дыхания у детей» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1023-1032.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1023-1032
© Просекова Е.В. и соавт., 2019

For citation:

E.V. Prosekova, N.G. Plekhova, A.I. Turyanskaya, V.A. Sabynych "Structural and functional characteristics of the T helpers 17 subpopulation in allergic diseases of the respiratory organs in children", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1023-1032.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1023-1032
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1023-1032

Диагностически значимое увеличение абсолютного и относительного количества Т-хелперов 17 типа с изменением их функциональных характеристик, как по степени экспрессии рецептора хемокина CCR6 (CD196), так и по наличию в них интерлейкина-17А, было установлено у детей с atopической бронхиальной астмой и аллергическим ринитом. Анализ содержания указанной субпопуляции Т-хелперов 17 типа и концентрации интерлейкинов-17А, 17F в сыворотке крови детей при atopической бронхиальной астме и аллергическом рините показал вариативность функциональных и количественных характеристик клеток в зависимости от распространенности аллергического воспаления, наличие дисбаланса в системе интерлейкина-17, а также влияние Th17-лимфоцитов на различные ассоциированные с Th1- и Th2-ответом аспекты воспаления и гиперреактивности бронхов.

Ключевые слова: Т-хелперы 17, интерлейкин-17А, интерлейкин-17F, аллергический ринит, atopическая бронхиальная астма, дети

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE T HELPER 17 SUBPOPULATION IN ALLERGIC DISEASES OF THE RESPIRATORY ORGANS IN CHILDREN

Prosekova E.V., Plekhova N.G., Turyanskaya A.I., Sabynych V.A.

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Phenotypes of asthma and allergic rhinitis are classified depending on the prevailing direction of the immune response the T lymphocyte profile and spectrum of cytokines that regulate the subpopulations of T lymphocyte helper cells. Therefore, the studies on the pathogenesis in various phenotypes of allergic respiratory diseases, and assessment of structural and functional characteristics of Th17 lymphocytes and interleukin 17 are relevant. The purpose of the present study was to analyze the subpopulations of Th17 lymphocytes and IL-17A, IL-17F interleukins in children with atopical asthma and allergic rhinitis. Materials and methods: a comprehensive assessment of structural and functional characteristics of T helper cells was carried out in 60 children aged 3–11 years with a verified diagnosis of atopical asthma. In 44 children (73.33% of total) bronchial asthma was combined with allergic rhinitis, and 30 healthy peers formed the control group. The population and subpopulation composition of blood lymphocytes was assessed by flow cytometry using monoclonal antibodies to CD3, CD4, CD8, CD19, CD45RA, CD45RO and CD196. To determine the intracellular content of IL-17, monoclonal antibodies against IL-17A (clone REA1063) labeled with PE-Vio770, isotypic control of antibodies against REA (Miltenyi Biotec GmbH, Germany) were used. The contents of total, specific IgE and interleukins IL-17A and IL-17F were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay in the blood serum. Statistical processing of the results was performed using the “Statistica 10” applied software. When studying functional and quantitative characteristics of immunocompetent cells in children with atopical bronchial asthma and allergic rhinitis, a sufficient variability was revealed for relative and absolute numbers of CD3⁺CD4⁺CD8⁺, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺ and CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ T lymphocyte subpopulations in peripheral blood, without significant differences with appropriate parameters in healthy controls ($p < 0.001$). A significant increase in the number of T lymphocytes was found in children with atopical bronchial asthma, with respect to CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ subpopulation ($p < 0.001$), the differentiated population of CD3CD4 positive T helpers ($p < 0.05$), and the Th effector subpopulations expressing both isoforms of CD45RA and CD45RO receptor ($p < 0.01$). The proportion of CD4CD45RO positive memory cells in children with atopical bronchial asthma and allergic rhinitis proved to be lower ($p < 0.001$), and the number of CD8⁺CD45RO⁺T lymphocytes, on the contrary, was higher ($p < 0.025$) than in the group of healthy controls. A diagnostically significant increase in the absolute and relative amounts of T helper 17 type with detectable changes in their functional characteristics, i.e., by the CCR6 chemokine receptor (CD196) expression levels, and presence of IL17A interleukin in children with atopical asthma and allergic rhinitis. The contents of this T helper 17 type subpopulation, and concentration of interleukins IL-17A, IL-17F in the blood serum of children with atopical asthma and allergic rhinitis showed the variability of functional and quantitative characteristics of cells that depended on the prevalence of allergic inflammation, evident imbalance in the interleukin 17 system, and the influence of Th17 lymphocytes on various aspects of inflammation and bronchial hyperreactivity associated with Th1 and Th2 response.

Keywords: T helper 17, 17A, 17F interleukins, allergic rhinitis, atopical bronchial asthma, children

Введение

В последние десятилетия значительные масштабы приобретает распространенность аллергических заболеваний у детей, среди которых бронхиальная астма и аллергический ринит являются глобальной медико-социальной проблемой здравоохранения [12, 15, 37]. Клинические фенотипы бронхиальной астмы и аллергического ринита разделяются в зависимости от преобладающего направления иммунного ответа по профилю Т-лимфоцитов. Биомаркерами эндотипов заболеваний являются цитокины, регулирующие и определяющие профиль Т-лимфоцитов хелперов (Th1, Th2, Th17) [7, 35].

На современном этапе бронхиальная астма и аллергический ринит рассматриваются как хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в эффекторной фазе которого участвует широкий спектр иммунокомпетентных клеток и цитокинов [10, 11, 20, 35, 37]. Патогенетические механизмы бронхиальной астмы (БА) и аллергического ринита (АР) имеют генетическую основу, включают дисбаланс Th1/Th2-опосредованных иммунных реакций с преобладанием Th2-профиля иммунного ответа с формированием предрасположенности развития реакций гиперчувствительности немедленного типа с эозинофильным воспалением в дыхательных путях [1, 11, 17, 23, 36]. Развитие и персистенция нейтрофильного воспаления при БА обусловлены активацией Th17-клеток и ассоциируются с продуктами активных нейтрофилов (нейтрофильной эластазой, 1-антитрипсином, IL-8, IL-17) [16]. Поляризация иммунного ответа в направлении образования Th17-клеток играет определяющую роль в иммунопатогенезе широкого спектра иммуновоспалительных заболеваний человека, включая аллергические заболевания [9, 18, 31].

В формировании и дифференцировке Th17 участвуют трансформирующий фактор роста β , IL-1 и IL-6, факторы транскрипции. Th-регуляторные (Treg) подавляют экспрессию фактора транскрипции ROR γ t (retinoic acid-receptor-related orphan receptor), а под влиянием провоспалительных цитокинов могут трансформироваться в Th17-клетки [23, 30]. Дифференцировка наивных Т-клеток в эффекторы сопровождается приобретением цитокинового профиля, определяющего их функциональную активность. Современные методологические технологии позволяют проводить анализ отдельных субпопуляций лимфоцитов Th на основании продукции ими цитокинов [27]. Изучение уровней цитокинов предоставляет информацию о функциональной активности различных типов иммунокомпетентных клеток, тяжести и распространенности

воспалительного процесса, активации клеток-эффекторов, стадии развития аллергических и аутоиммунных заболеваний, что актуально при дифференциальной диагностике иммунопатогенетических механизмов. Актуальными являются исследования патогенетических механизмов различных фенотипов аллергических заболеваний дыхательных путей и оценка структурно-функциональных характеристик Th17-лимфоцитов и интерлейкина-17.

Цель исследования — провести анализ субпопуляций Th17-лимфоцитов и интерлейкинов-17A, 17F при atopической бронхиальной астме и аллергическом рините у детей.

Материалы и методы

В исследование включено 90 детей в возрасте 3–11 лет, из них 60 детей с верифицированным диагнозом «атопическая бронхиальная астма» с легким (11,67%) и средней степени тяжести (88,33%) клиническим течением болезни с противовоспалительной базисной терапией ингаляционными глюкокортикостероидными препаратами, у 44 (73,33%) детей БА сочеталась с аллергическим ринитом, и 30 здоровых детей, составивших группу сравнения (контроля). Все дети наблюдались в КГБУЗ «Владивостокский клинко-диагностический центр». Верификация фенотипа заболевания проводилась в соответствии с рекомендациями международных согласительных документов PRACTALL (2008), European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Global strategy for asthma management and prevention (2018) и ARIA (2016) [20]. Критериями исключения из исследования являлись вирус-индуцированный фенотип, тяжелое течение бронхиальной астмы и применение иммунокорректирующих препаратов в предшествующие шесть месяцев. Клинико-лабораторное обследование осуществляли на кафедре клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии и в центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России. Дизайн исследования одобрен Междисциплинарным комитетом по этике ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России 23.06.2014 года, протокол № 7.

Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с национальными рекомендациями [6]. Для выявления субпопуляций лимфоцитов периферическая кровь пациентов забиралась в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА (BD Vacutainer®). Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора Red Blood Cell Lysis Solution (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Для удаления эритроци-

тов образцы тоекратно отмывали раствором Версена (ООО ПанЭко, Москва) путем центрифугирования и ресуспендирования клеточного осадка. Иммунофенотипирование клеток проводили с использованием моноклональных антител мыши, специфичных к человеческим и конъюгированных с FITC, фикоэритрином (PE), аллофикоцианином (APC) и VioBlue (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Иммунологические параметры включали в себя следующие показатели: стандартное иммунологическое исследование: Т-лимфоциты (CD3⁺), Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺), цитотоксические Т-клетки (CD3⁺CD8⁺), В-лимфоциты (CD19⁺); дополнительное исследование: определение экспрессии дифференцировочного антигена CD45 с изоформами RA и RO (клон T6D11 и REA611 соответственно, Miltenyi Biotec GmbH, Германия) на субпопуляциях наивных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺), «терминально дифференцированных» CD45RO-позитивных Th-клетках памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺), а также несущих две изоформы дубль-позитивных переходных Th-клетках (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺). Th17-клетки идентифицировали как CD3⁺CD4⁺позитивные события с добавочным сигналом на наличие экспрессии рецептора к хемокину CCR6, специфичному для Th17-клеток (CD196 (CCR6)-APC, клон REA277; Miltenyi Biotec GmbH, Германия) [14]. Для определения внутриклеточного содержания цитокина IL-17 использовали моноклональные антитела против IL-17A (клон REA1063), меченные PE-Vio770, изотипический контроль антитела против REA (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Пермеабиллизацию клеток проводили с использованием Inside Perm раствора (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) в течение 5 минут при комнатной температуре в темноте, добавляли фосфатно-солевой буфер и центрифугировали в течение 5 минут при 500 g, после чего удаляли супернатант. Подбор оптимальных комбинаций антител и конъюгированных с ними флуорохромов производили на основании принципов, изложенных в литературе [25]. Окрашивание моноклональными антителами проводили одновременно для поверхностных и внутриклеточных маркеров в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. Для исключения неспецифического связывания моноклональных антител использовался соответствующий флуорохром-конъюгированный изотипический контроль. Для поправки на неспецифическое окрашивание из полученного значения вычитали процент клеток, позитивных при окраске изотип-контролем (как правило, менее 1%).

Субпопуляции лимфоцитов определяли методом мультицветной проточной цитометрии, используя автоматический анализатор — проточ-

ный цитофлуориметр MACSQuant TM Analyzer 10 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия), оснащенный тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Данные анализировали, набирая не менее 30 000 лейкоцитов в образец. Популяция CD3⁺PE-меченных лимфоцитов гейтировалась с использованием флуоресцентного канала (FL3) и параметра бокового светорассеяния (SSC). Соответственно, двухпараметровые дот-плоты были созданы для оценки процентного содержания CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ (Th naïve), CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ (Th em, эффекторные Т-клетки памяти), CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ (Th eff), CD3⁺CD4⁺CD196⁺ (Th17 CD196⁺) и CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺ (Th IL-17A). Изотипический контроль использовали для подтверждения специфичности моноклональных антител. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ MACSQuantify™ Software v. 2.5 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) и Kaluza™ v. 1.2 (Beckman Coulter, США).

Концентрации общего и специфического IgE и интерлейкинов-17A и 17F в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов реактивов согласно прилагаемой инструкции (определение IgE в МЕ/мл, ООО «Компания Алкор Био», Санкт-Петербург; порог чувствительности 1,0 МЕ/мл и IL-17A и IL-17F в пг/мл, порог чувствительности 0,5 и 3,3 пг/мл соответственно, eBiosciens, Bender Medsystems GmbH, Австрия). Уровни иммуноглобулинов IgG, IgM и IgA определяли с помощью турбидиметрии (СОБА-S INTEGRA — 800).

Для статистической обработки цифровых данных использовали методы параметрической (при нормальном распределении показателей и коэффициенте вариации CV ≤ 30%) и непараметрической (при распределении, отличном от нормального, и коэффициенте вариации CV > 30%) статистики с использованием программы Statistica 10. Проводили подсчет средней арифметической (M), медианы (Me), среднего квадратичного отклонения (σ), средней ошибки средней арифметической (±m), верхнего и нижнего квартиля (Q_{0,25}-Q_{0,75}), доверительного интервала (ДИ), коэффициента достоверности показателя (t) и различий (t и p). Использовали методы корреляционного анализа при подсчете коэффициента ранговой корреляции Спирмена с проверкой нормальности распределения значений признака (Шапиро—Уилка). Объем выполненных исследований и использование соответствующих статистических методов позволили оценить результаты с достоверностью и критическим уровнем значимости p < 0,05.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ (АЗ) ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ И ЗДОРОВЫХ СВЕРСТНИКОВ

TABLE 1. INDICATORS OF IMMUNE CELLS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF CHILDREN WITH ALLERGIC DISEASES (AD) OF THE RESPIRATORY SYSTEM AND HEALTHY PEERS

№	Показатели, единицы измерения удельного веса и абсолютного числа Indicators, units of measurement specific weight and absolute number		Группы наблюдения Monitoring groups				Критерий Стьюдента, вероятность ошибки Student's t-test, probability of error
			здоровые дети healthy children (n = 30)		дети с АЗ children with AD (n = 60)		
			M±m	ДИ CI	M±m	ДИ CI	t * p
1	Лейкоциты Leukocytes	10 ⁹ /л 10 ⁹ /l	7,31±0,30	6,81-7,81	7,39±0,13	6,89-7,90	0,35 (p > 0,05)
2	Лимфоциты Lymphocytes	%	44,39±1,74	41,51-47,27	37,10±1,65	34,36-39,83	3,05 (p < 0,01)
		10 ⁹ /л 10 ⁹ /l	3,37±0,18	3,08-3,66	2,78±0,16	2,52-3,06	2,53 (p < 0,05)
3	Гранулоциты Granulocytes	%	46,26±1,16	44,33-48,18	54,98±1,94	50,76-58,20	3,87 (p < 0,01)
		10 ⁹ /л 10 ⁹ /l	3,48±0,19	3,15-3,81	4,11±0,21	3,74-4,47	2,12 (p < 0,05)
4	Т-лимфоциты T lymphocytes CD3 ⁺ CD19 ⁻	%	71,26±1,15	69,34-73,17	71,03±0,90	69,53-72,94	0,13 (p > 0,05)
		кл/мкл cells/μl	2356,90±126,95	2146,17-2567,65	1902,83±112,39	1716,26-2089,41	2,44 (p < 0,05)
5	В-лимфоциты B lymphocytes CD3 ⁺ CD19 ⁺	%	16,49±0,91	14,99-17,99	15,23±0,69	14,05-16,41	1,01 (p > 0,05)
		кл/мкл cells/μl	548,59±41,31	480,02-617,16	412,92±34,35	355,89-469,93	2,31 (p < 0,05)

Примечание. ДИ – доверительный интервал 95-99%, t – p – коэффициент достоверности различий показателей в исследуемых группах.

Note. CI, confidence interval 95-99%; t – p, coefficient of reliability of differences in the tested groups.

Результаты

У детей с аллергическими заболеваниями органов дыхания по сравнению со здоровыми сверстниками выявлены: равнозначная обеспеченность лейкоцитами, преобладание гранулоцитов, снижение абсолютного числа лимфоцитов и Т-лимфоцитов, низкое абсолютное число В-лимфоцитов (табл. 1).

У детей с бронхиальной астмой и аллергическим ринитом выявлено повышенное содержание сывороточного общего IgE (318,20±25,23 МЕ/мл, ДИ 306,69-443,89 МЕ/мл против 51,80±14,19 МЕ/мл, ДИ- 25,95-79,96 МЕ/мл в группе здоровых сверстников, соответственно, при p < 0,01). Значимые уровни специфического IgE к неинфекционным аллергенам определялись только в группе детей с аллергическими заболеваниями.

В группе здоровых детей исследования в сыворотке крови уровня IL-17A выявили вариации показателей в диапазоне от 23,8 до 97,9 пг/мл с медианой (Me) 68,75 пг/мл, нижним и верхним квартилями (Q_{0,25}-Q_{0,75}) 47,4-83,31 пг/мл и значительно более высокое содержание IL-17A у детей с БА (89,8-365,5 пг/мл с Me = 123,7 пг/мл и Q_{0,25}-Q_{0,75} – 107-139 пг/мл). В группе детей с БА в сочетании с АР показатели сывороточного содержания IL-17A в сравнении с данными детей с БА были выше (Me = 126,25 пг/мл, Q_{0,25}-Q_{0,75} – 106,03-150,08 пг/мл и Me = 119,5 пг/мл, Q_{0,25}-Q_{0,75} – 108,5-125,9 пг/мл соответственно). В исследовании не зафиксировано различий в показателях сывороточного содержания IL-17A в зависимости от периода заболевания. В период клинической ремиссии и в период обострения бронхиальной астмы уровни сывороточного IL-17A составили Me = 123,9 пг/мл и Q_{0,25}-Q_{0,75} – 107-137 пг/мл и Me = 122,15 пг/мл и Q_{0,25}-Q_{0,75} – 107,98-

148,13 пг/мл, соответственно, при $p > 0,05$. Диапазон сывороточного содержания IL-17F у детей с БА составил 19,17-75,98 пг/мл с Me = 28,58 пг/мл и $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ – 25,23-36,50 пг/мл, у здоровых сверстников определялись практически аналогичные уровни (21,57-75,98 пг/мл

с Me = 27,7 пг/мл и $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ – 25,31-34,98 пг/мл). Коэффициент корреляции сывороточного содержания IL-17A и уровней общего и специфического IgE в группе контроля составил $r = -0,103$ и $r = 0,111$, по IL-17F – $r = 0,215$ и $r = 0,391$ соответственно. У детей с atopической бронхиальной

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ (АЗ) ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ И ЗДОРОВЫХ СВЕРСТНИКОВ

TABLE 2. INDICATORS OF SUBPOPULATIONS OF T CELLS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF CHILDREN WITH ALLERGIC DISEASES (AD) OF THE RESPIRATORY SYSTEM AND HEALTHY PEERS

№	Фенотип Т-клеток (показатели, единицы измерения % от целевой популяции и абсолютного числа) T cell phenotype (indicators, units % of the target population and absolute number)		Группы наблюдения Monitoring groups	
			здоровые дети healthy children (n = 20)	дети с АЗ children with AD (n = 30)
			M±m	M±m
1	CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	27,60±0,92	26,1±2,7
		кл/мкл cells/μl	7360,0±352,0	6372,0±167,6
2	CD3 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	%	64,3±7,4	38,95±2,70**
		кл/мкл cells/μl	21710,0±278,0	7461,0±167,6**
3	CD3 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	%	30,1±3,4	9,6±0,7***
		кл/мкл cells/μl	7987,0±365,0	2619,0±165,3***
4	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RA ⁺	%	21,50±0,67	22,2±0,8
		кл/мкл cells/μl	5740,0±89,5	6740,0±46,0
5	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁺	%	7,80±0,36	9,50±0,62*
		кл/мкл cells/μl	2060,9±230,8	2780,0±220,5*
6	CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	35,8±4,8	42,2±3,9*
		кл/мкл cells/μl	10350,0±521,0	14072,0±450,5*
7	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (Th naïve)	%	27,6±4,1	28,7±1,8
		кл/мкл cells/μl	7377,0±47,4	7667,0±74,4
8	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ (Th em)	%	19,0±3,9	17,7±0,7*
		кл/мкл cells/μl	5400,0±23,8	5238,0±33,3*
9	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺ (Th eff)	%	30,9±4,2	0,490±0,004**
		кл/мкл cells/μl	781,3±33,3	12,5±1,3**
10	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD196 ⁺ (Th17)	%	9,49±1,60	14,50±0,77***
		кл/мкл cells/μl	93,0±9,3	127,0±72,0
11	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL-17A ⁺ (Th17 IL-17A)	%	0,53±0,08	2,38±0,70***

Примечание. * – коэффициент достоверности различий показателей в исследуемых группах (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$).

Note. *, coefficient of reliability of differences in performance in the studied groups (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

астмой по сравнению со здоровыми сверстниками выявлен высокий уровень сывороточного IgE ($p < 0,01$), прямая зависимость сывороточного содержания IL-17A и IgE ($r = 0,35$).

В развитии специфического воспалительного процесса при БА участие принимает преимущественно клеточное звено иммунитета. Первичный контакт наивных Т-клеток с антигеном сопровождается их клональной экспансией и дифференцировкой в различные субпопуляции эффекторных клеток.

Результаты исследования функциональных и количественных характеристик иммунокомпетентных клеток у детей с atopической бронхиальной астмой и аллергическим ринитом и здоровых сверстников выявили вариативность показателей без значимых различий по удельному весу Т-лимфоцитов цитотоксических $CD3^+CD4^-CD8^+$, $CD3^+CD8^+CD45RA^+$ и $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$, достоверное увеличение субпопуляции $CD3^+CD8^+CD45RA^-CD45RO^+$ у детей с аллергическими заболеваниями органов дыхания ($p < 0,001$) (табл. 2). Снижение процента $CD3CD45RA$ -позитивных клеток и $CD3CD45RO$ иллюстрирует повышение пула дифференцированных клеток, не несущих на своей поверхности изоформы рецептора $CD45RO$ и $CD45RA$. В исследовании у детей с БА выявлена тенденцию к повышению дифференцированной популяции $CD3CD4$ -позитивных Т-хелперов ($p < 0,05$) и повышение количества Th-эффекторов, экспрессирующих обе изоформы рецептора $CD45RA$ и $CD45RO$ ($p < 0,01$). У детей с atopической бронхиальной астмой и аллергическим ринитом удельный вес $CD4CD45RO$ позитивных клеток памяти был ниже ($p < 0,001$), количество $CD8^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов выше ($p < 0,025$), чем в группе здоровых сверстников.

В периферической крови детей контрольной группы показатели популяции Th17 ($CD3^+CD4^+CD196^+$ лимфоциты) составили $9,49 \pm 1,6\%$ от $CD3^+CD4^+$ клеток, у детей с аллергическими заболеваниями органов дыхания удельный вес лимфоцитов данной субпопуляции составил $14,5 \pm 0,77\%$ ($p < 0,001$). Абсолютное содержание Th17 составило $93,0 \pm 9,3$ кл/мкл и $127,0 \pm 72,0$ кл/мкл в сравниваемых группах соответственно ($p = 0,002$) (табл. 2). Экспрессия рецептора $CD196$ (CCR6) отмечается на Т-клетках, наивных, В-клетках памяти и незрелых дендритных клетках. $CD196$ селективно связывает хемокин MIP-3 α /CCL20, который секретируется многими клетками и тканями организма. При взаимодействии с хемокинами индуцируются хемотаксическая активность незрелых Т-клеток памяти и преобразование в Th17 [34].

Корреляционный анализ не выявил значительной зависимости показателей от возраста и периода заболевания ($r = 0,12$, $p = 0,21$ для здоровых лиц и $r = 0,06$, $p = 0,25$ для детей с БА и АР). При учете поправки на возраст частота различия в показателях Th17 между двумя группами составила 0,013. По показателям популяции клеток, позитивных по продукции IL-17A Th17, в контрольной группе процент популяции IL-17A позитивных клеток составил $0,53 \pm 0,08\%$ от $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов, а у детей с БА и АР возрастал до $2,38 \pm 0,7\%$ ($p < 0,001$).

Обсуждение

Иммунокомпетентные клетки человека отражают реакции организма на негативное воздействие средовых физиологических или патологических факторов, активацию или истощение иммунной системы [2, 3, 18]. Эффекторные свойства Т-лимфоцитов определяются уровнем зрелости или стадией дифференцировки клетки. Цитотоксическим Т-лимфоцитам (фенотип $CD3^+CD8^+$) принадлежит ведущая роль в специфической защите организма от внутриклеточных патогенов и собственных измененных клеток с реализацией эффекторных свойств через синтез цитокинов, секреторную дегрануляцию и высвобождение перфорина и гранзимов. Интенсивность иммунных реакций, процессов пролиферации, миграции и дифференцировки клеток, нормальное функционирование иммунной системы обеспечиваются балансом продукции и акцепции цитокинов, образующих цитокиновую сеть [29].

Проведенные исследования отметили усиление экспрессии активационных маркеров регуляции распознавания антигенов, запуска и реализации иммунного ответа, пролиферации и дифференцировки лимфоцитов у детей с atopической бронхиальной астмой и аллергическим ринитом по сравнению со здоровыми сверстниками. Не выявлено различий в содержании цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD4^-CD8^+$) в периферической крови у детей с аллергическими заболеваниями органов дыхания и здоровых сверстников, при достоверно более высоком числе клеток субпопуляции Т-хелперов ($CD3^+CD4^+CD8^-$) у детей с аллергическими заболеваниями. В группе последних зафиксированы изменения в субпопуляциях Т-клеток памяти как в отношении $CD4^+$, так и $CD8^+$ Т-лимфоцитов и удельный вес $CD4^+CD45RO^+$ клеток был значимо ниже, чем у здоровых лиц, что, вероятно, может быть связано с хемотаксисом их из периферической крови к месту воспаления [22]. Не обнаружено корреляции между тяжестью течения заболевания и степенью экспрессии

маркера клеток памяти (CD45RO) на CD4⁺T-клетках, процент CD4⁺CD45RO⁺T-клеток был выше у детей аллергическими заболеваниями по сравнению со здоровыми сверстниками. CD8CD45RO-позитивные T-клетки способны секретировать цитокины Th2, включая IL-4, IL-5 и IL-13.

Th17-лимфоциты — самостоятельная субпопуляция T-хелперов, дифференцировка наивных T-клеток в Th17-клетки у человека инициируется IL-6 и IL-1 β , без необходимости воздействия трансформирующего фактора роста TGF- β [7]. IL-17 не ингибирует дифференцировку Th1 и Th2 или этот эффект выражен у него чрезвычайно слабо, поэтому Th1- и Th2-клетки обычно доминируют над Th17 [28]. В норме Th17 составляют около 1% от периферических CD3⁺CD4⁺ клеток человека и характеризуются преимущественной секрецией провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли TNF β , IL-17A, IL-17F, IL-22 и др.) [33]. Th17-лимфоциты способны модулировать иммунный ответ и в патогенезе бронхиальной астмы влияют на разные аспекты воспаления и бронхиальной гиперреактивности [4, 5, 13, 32]. В исследованиях Zhao и соавт. зафиксировано повышение содержания Th17-лимфоцитов при бронхиальной астме [38]. Также отмечается, что повышение аллерген-индуцированного содержания IL-17 связано с клиническим проявлением аллергического ринита у детей [22]. Созревающие T-клетки меняют набор хемокиновых рецепторов и молекул адгезии в зависимости от внеклеточных сигналов, что определяет их перемещение в зону выполнения специфических эффекторных функций. При аллергической астме экспрессия CCR6 играет важную роль в регуляции рекрутирования эффекторных T-клеток в ткань [19]. При БА лимфоциты Th17, синтезирующие IL-17A, оказывают воздействие на продукцию муцина и гиперплазию бокаловидных клеток. IL-17F, совместно с IL-17A, вызывает продукцию хемокинов, влияет на транскрипцию мРНК и трансляцию белка [24]. В нашем исследовании у детей с atopической бронхиальной астмой и аллергическим ринитом выявлено высокое содержание интерлейкинов-17 в сыворотке крови и опреде-

лена прямая корреляция уровня IL-17A с числом нейтрофилов и Th17-лимфоцитов в периферической крови ($r = 0,366$ и $r = 0,415$ соответственно) и эозинофилов в назальном секрете ($r = 0,324$), при отсутствии связи с числом эозинофилов в периферической крови ($r = 0,04$). У здоровых детей выявлена прямая корреляция умеренной силы показателей содержания IL-17A и IL-17F с абсолютным числом эозинофилов в периферической крови ($r = 0,312$ и $r = 0,326$ соответственно). В экспериментальной модели показано, что лимфоциты Th17 опосредуют стероидрезистентное нейтрофильное воспаление дыхательных путей [26] и среди 6 членов семейства интерлейкина-17 цитокин IL-17E усиливает воспаление, воздействуя на продукцию IL-4 и IL-13, а IL-17A и IL-17F индуцируют нейтрофильный тип воспаления через IL-6 и IL-8. При тяжелой астме Th17-лимфоциты, секретирующие IL-17A или IL-17F, могут способствовать рекрутингу нейтрофилов в дыхательные пути [16].

Проведенные исследования структурно-функциональных характеристик субпопуляции T-хелперов 17 и интерлейкинов-17 у детей с atopической бронхиальной астмой и аллергическим ринитом выявили диагностически значимые увеличения количества Th17-лимфоцитов и изменения их функциональных характеристик как по степени экспрессии рецептора хемокина CCR6 (CD196), так и по наличию в них IL-17A, активацию синтеза IL-17A и IL-17F. Интерлейкин-17, стимулируя синтез IL-6 и IL-1 β , активирует положительную обратную связь, способствуя дифференцировке нативных T-клеток в Th17-клетки [21, 23].

Анализ содержания Th17-лимфоцитов и интерлейкинов-17A, 17F при atopической бронхиальной астме и аллергическом рините у детей зафиксировал вариативность функциональных и количественных характеристик Th17-клеток, интерлейкина-17 в зависимости от распространенности аллергического воспаления, значимость дисбаланса в системе интерлейкина-17 и влияние Th17-лимфоцитов на различные с Th1 и Th2 аспекты воспаления и гиперреактивности бронхов.

Список литературы / References

1. Кайдашев И.П. T-клеточная регуляция при atopических заболеваниях // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология, 2011. № 9-10. С. 18-21. [Kaydashev I.P. T cell regulation in atopic diseases. *Klinicheskaya immunologiya. Allergologiya. Infektologiya = Clinical Immunology. Allergology. Infectology*, 2011, no. 9-10, pp. 18-21. (In Russ.)]
2. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Волков А.Е., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими T-лимфоцитами различного уровня дифференцировки // Тихоокеанский медицинский журнал, 2015. № 2. С. 30-35. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Volkov A.E., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Polevshchikov A.V. Analysis of the expression level of CD56 and

CD57 by cytotoxic T lymphocytes of different levels of differentiation. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2015, no. 2, pp. 30-35. (In Russ.)]

3. Курбачева О.М., Жестков А.В., Нагаткин Д.А., Кулагина В.В., Нагаткина О.В. Современный взгляд на иммунопатогенез бронхиальной астмы // Российский аллергологический журнал, 2016. № 2. С. 10-14. [Kurbacheva O.M., Zhestkov A.V., Nagatkin D.A., Kulagina V.V., Nagatkina O.V. Modern view on the immunopathogenesis of bronchial asthma. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2016, no. 2, pp. 10-14. (In Russ.)]

4. 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. The relationship of the level of IL-17, IL-10 with the degree of control of asthma. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Journal of Modern Clinical Medicine*, 2017, Vol. 10, no. 3, pp. 35-38. (In Russ.)]

5. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. М.: Фолиант, 2018. 512 с. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases]. Moscow: Foliant, 2018. 512 p.

6. Хайдуков С.В., Байдун Л.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 4. С. 974-992. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. The standardized technique "Study subpopulations of peripheral blood lymphocytes by using flow cytometry". *Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 4, pp. 974-992. (In Russ.)]

7. Acosta-Rodriguez E.V., Napolitani G., Lanzavecchia A., Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 9, pp. 942-949.

8. Agache C., Akdis C., Jutel M., Virchow J.S. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*, 2012, Vol. 67, pp. 835-846.

9. Agache I., Ciobanu C., Agache C., Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respiratory Med.*, 2010, Vol. 104, pp. 1131-1137.

10. Akdis C.A. Global atlas of asthma. Switzerland: Published by the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (ed.: Akdis C.A., Agache I.), 2013, pp. 2-179.

11. Akdis M. The pathogenesis of asthma. Global atlas of Asthma, 2013, pp. 28-30.

12. Bacharier L.B., Boner A., Carlsen K.-H., Eigenmann P.A., Frischer T., Götz M., Helms P. J., Hunt J., Liu A., Papadopoulos N., Platts-Mills T., Pohunek P., Simons F.E.R., Valovirta E., Wahn U., Wildhaber J., The European Pediatric Asthma Group. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy*, 2008, Vol. 63, pp. 5-34.

13. Bhakta N.R. IL-17 and "Th2-high" asthma: Adding fuel to the fire? *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, pp. 1187-1188.

14. Bossowski A., Moniuszko M., Idźkowska E., Dąbrowska M., Jeznach M., Sawicka B., Borysewicz-Sańczyk H., Bossowska A., Rusak M., Bodzenta Łukaszyk A. Evaluation of CD4⁺CD161⁺CD196⁺ and CD4⁺IL-17⁺ Th17 cells in the peripheral blood of young patients with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab.*, 2012, Vol. 18, no. 3, pp. 89-95.

15. Bousquet J., Pfaar O., Togias A. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Care pathways for allergen immunotherapy. *Allergy*, 2019, Vol. 74, no. 11, pp. 2087-2102.

16. Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Th17-cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*, 2011, Vol. 66, pp. 989-998.

17. Dehzad N., Bopp T., Reuter S., Klein M., Martin H., Ulges A., Stassen M., Schild H., Buhl R., Schmitt E., Taube C. Regulatory T-cells more effectively suppress Th1-included airway inflammation compared with Th2. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, pp. 238-244.

18. Doe C., Bafahel M., Siddiqui S., Desai D., Mistry V., Rugman P., McCormick M., Woods J., May R., Sleeman M.A., Anderson I.K., Brightling C.E. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. *CHEST*, 2010, Vol. 138, no. 5, pp. 1140-1147.

19. Francis J.N., Sabroe I., Lloyd C.M., Durham S.R., Till S.J. Elevated CCR6⁺ CD4⁺ T lymphocytes in tissue compared with blood and induction of CCL20 during the asthmatic late response. *Clin. Exp. Immunol.*, 2008, Vol. 152, no. 3, pp. 440-447.

20. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2018. Available from: ginasthma.org.

21. Hayashida S., Uchi H., Moroi Y., Furue M. Decrease in circulating Th17 cells correlates with increased levels of CCL17, IgE and eosinophils in atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.*, 2011, Vol. 61, no. 3, pp. 180-186.

22. Kerzel S., Dehne J., Rogosch T., Schaub B., Maier R.F., Zemlin M. Th17 cell frequency in peripheral blood from children with allergic asthma correlates with the level of asthma control. *J. Pediatr.*, 2012, Vol. 61, no. 6, pp. 1172-1174.

23. Kimura A., Kishimoto T. IL 6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, no. 7, pp. 1830-1835.

24. Koch S., Sopel N., Finotto S. Th9 and other IL-9-producing cells in allergic asthma. *Semin. Immunopathol.*, 2017, Vol. 3, no. 1, pp. 55-68.
25. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.*, 2007, Vol. 27, no. 3, pp. 469-485.
26. McKinley L., Alcorn J.F., Peterson A., Dupont R.B., Kapadia S., Logar A., Henry A., Irvin C.G., Piganelli J.D., Ray A., Kolls J.K. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 6, pp. 4089-4097.
27. Muehling L.M., Lawrence M.G., Woodfolk J.A. Pathogenic CD4⁺ T cells in patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 140, no. 6, pp. 1523-1540.
28. Nakae S., Iwakura Y., Suto H., Galli S.J. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation by Th17. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 81, pp. 1258-1268.
29. Nieminen K., Valovirta E., Savolainen J. Clinical outcome and IL-17, IL-23, IL-27 and FOXP3 expression in peripheral blood mononuclear cells of pollen-allergic children during sublingual immunotherapy. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2010, Vol. 21, pp. e174-e184.
30. Qian Y., Kang Z., Liu C., Li X. IL-17 signaling in host defense and inflammatory diseases. *Cell. Mol. Immunol.*, 2010, Vol. 7, no. 5, pp. 328-333.
31. Qu N., Xu M., Mizoguchi I., Furusawa J., Kaneko K., Watanabe K., Mizuguchi J., Itoh M., Kawakami Y., Yoshimoto T. Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, 968549. doi: 10.1155/2013/968549.
32. Seoung J.P., Lee Y.C. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. *Respir. Res.*, 2010, Vol. 11, no. 1, p. 78.
33. Singh S.P., Zhang H.H., Foley J.F., Hedrick M.N., Farber J.M. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 1, pp. 214-221.
34. Sundrud M.S., Trivigno C. Identity crisis of Th17 cells: many forms, many functions, many questions. *Semin. Immunol.*, 2013, Vol. 25, no. 4, pp. 263-272.
35. van de Veen W., Akdis M. Mechanisms of immune regulation in allergy. *Global Atlas of Allergy*, 2014, pp. 90-91.
36. Wenzel S. Phenotypes & Endotypes: Emerging concepts on asthma heterogeneity. *Global Atlas of Asthma*, 2013, pp. 34-36.
37. Winer R., Qin X., Harrington T., Moorman J., Zahran H. Asthma incidence among children and adults: findings from the behavioral risk factor surveillance system asthma callback survey-United States, 2006-2008. *J. Asthma*, 2012, Vol. 49, pp. 16-22.
38. Zhao Y., Yang J., Gao Y.D., Guo W. Th17 immunity in patients with allergic asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2010, Vol. 151, pp. 297-307.

Авторы:

Просекова Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Плехова Н.Г. — д.б.н., заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Турянская А.И. — ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, аспирант ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Сабыныч В.А. — к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Authors:

Prosekova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Plekhova N.G., PhD, MD (Biology), Head, Central Scientific Research Laboratory, Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Turyanskaya A.I., Assistant Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Postgraduate Student, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Sabynych V.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ С СИНДРОМОМ МЕНИНГИЗМА

Жирков А.А., Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Монахова Н.Е.,
Бессонова Т.В.

ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург,
Россия

Резюме. Актуальность изучения особенностей интратекального клеточного иммунного ответа на инфекции центральной нервной системы обусловлена ограниченностью имеющихся сведений о механизмах иммунной защиты мозга в норме и патологии. Использование в клинической лабораторной диагностике метода многоцветной проточной цитометрии позволило углубленно изучать клеточный состав биологических жидкостей, включая цереброспинальную жидкость (ЦСЖ). Однако в современной литературе данные о субпопуляционном составе лимфоцитов ЦСЖ единичны. Существенной проблемой остается получение референсных значений. Исследование состава пула лимфоцитов ЦСЖ у пациентов с подозрением на инфекционное поражение мозга, не подтвержденным проведенным обследованием, может явиться одним из возможных решений проблемы. К числу таких заболеваний относятся острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), протекающие с синдромом менингизма. Цель работы — охарактеризовать субпопуляционный состав лимфоцитов ЦСЖ детей с ОРВИ без менингита для получения базисных (контрольных) значений в диагностике воспалительных заболеваний ЦНС. Исследован субпопуляционный состав лимфоцитов ЦСЖ 27 детей, переносящих ОРВИ с синдромом менингизма, методом проточной цитометрии на анализаторе FACSCalibur с использованием реагентов BD MultiTEST IMK Kit и последующей обработкой данных с помощью программы FlowJo. Исследовано содержание основных: Т-клеток (CD3⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺Th), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺CTL), натуральных киллеров (CD3⁺CD16⁺CD56⁺NK), В-клеток (CD3⁺CD19⁺) и малых субпопуляций лимфоцитов: двойных позитивных (DP) (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) и двойных негативных (DN) (CD3⁺CD4⁺CD8⁻) Т-клеток, NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), CD3⁺CD8^{bright}, CD3⁺CD8^{dim}, CD3⁺CD8⁺NK. Статистическая обработка данных выполнена с использованием стандартной программы GraphPad Prism 5. Среди основных популяций в ЦСЖ выявлено доминирование Т-лимфоцитов (96,2%) и их субпопуляций — CD4⁺Th (53,4%) и CD8⁺CTL (28,2%) — при незначительном количестве NK (2,2%) и В-лимфоцитов (0,7%). Среднее относительное содержание малых субпопуляций — DN или DP Т-клеток и NKT-клеток — составило 5,3, 4,0 и 9% соответственно. Выявлены возрастные особенности содержания основных и малых субпопуляций. С увеличением возраста

Адрес для переписки:

Жирков Антон Анатольевич
ФГБУ «Детский научно-клинический центр
инфекционных болезней» ФМБА России
197002, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Профессора Попова, 9.
Тел.: 8 (911) 932-55-32.
E-mail: ant-zhirkov@yandex.ru

Address for correspondence:

Zhirkov Anton A.
Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases,
Federal Medical-Biological Agency
197002, Russian Federation, St. Petersburg, Prof. Popov str., 9.
Phone: 7 (911) 932-55-32.
E-mail: ant-zhirkov@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Жирков, Л.А. Алексеева, Г.Ф. Железникова,
Н.Е. Монахова, Т.В. Бессонова «Субпопуляционный
состав лимфоцитов цереброспинальной жидкости
детей с острой респираторной вирусной
инфекцией, протекающей с синдромом менингизма»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6.
С. 1033–1042.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1033-1042
© Жирков А.А. и соавт., 2019

For citation:

A.A. Zhirkov, L.A. Alekseeva, G.F. Zheleznikova,
N.E. Monakhova, T.V. Bessonova "Subsets of cerebrospinal
fluid lymphocytes in acute pediatric respiratory viral infection
with meningeal syndrome", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6,
pp. 1033–1042.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1033-1042
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1033-1042

у детей в ЦСЖ нарастает относительное количество $CD3^+T$ -клеток и $CD4^+Th$ (как и соотношение $CD4/CD8$) и снижается доля NK, а также DN и $CD3^+CD8^{dim}T$ -лимфоцитов. Полученные результаты характеризуют особенности лимфоцитарного пула ЦСЖ у детей без воспалительного процесса в ЦНС и могут быть использованы в качестве контроля (отсутствие признаков воспаления в ЦСЖ) при изучении иммунопатогенеза нейроинфекций и других воспалительных заболеваний ЦНС у детей разных возрастных групп.

Ключевые слова: проточная цитометрия, иммунофенотипирование, лимфоциты, цереброспинальная жидкость, ОРВИ, менингизм, дети

SUBSETS OF CEREBROSPINAL FLUID LYMPHOCYTES IN ACUTE PEDIATRIC RESPIRATORY VIRAL INFECTION WITH MENINGEAL SYNDROME

Zhirkov A.A., Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Monakhova N.E., Bessonova T.V.

Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Current urgency of studying the intrathecal cellular immune response to infections of central nervous system is determined by limited knowledge on existing data about mechanisms of the brain immune protection in normal and diseased state. Implication of multi-colour flow cytometry in clinical laboratory diagnostics allowed to perform detailed studies of biological liquors, including cerebrospinal fluid (CSF). Currently, however, there are only scarce data on the lymphocyte subpopulations in CSF. Appropriate reference values remain a challenging issue. A study of CSF lymphocyte pool in absence of definite results at previous examination may be a potential way to resolve this problem. These clinical conditions include acute respiratory viral infections (ARVI), presenting with pseudomeningitis (meningism) syndrome. The aim of this work was to characterize the subsets of lymphocytes from CSF of the children with ARVI with the meningism symptoms in order to get basic (control) values for diagnostics of inflammatory brain diseases. We have studied subpopulation composition of the CSF lymphocytes from 27 children with ARVI complicated by the meningism (pseudomeningitis) by means of flow cytometry using FACSCalibur analyzer with BD MultiTEST IMK Kit reagents. The data evaluation was performed with FlowJo software. We have studied relative contents of the main subsets, i.e., total T cells ($CD3^+$); T helpers ($CD3^+CD4^+Th$); cytotoxic T cells ($CD3^+CD8^+CTL$); natural killers ($CD3^+CD16^+CD56^+NK$); B cells ($CD3^+CD19^+$), and minor lymphocyte subpopulations: double-positive (DP) ($CD3^+CD4^+CD8^+$); double-negative (DN) ($CD3^+CD4^-CD8^-$) T cells; NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$); $CD3^+CD8^{bright}$, $CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^+CD8^+NK$. Statistical evaluation was carried out with standard GraphPad Prism 5 software. Among the main lymphocyte populations in CSF, T cell were predominant (96.2%), as well as their subpopulations, i.e., $CD4^+Th$ (53.4%), and $CD8^+CTL$ (28.2%), with low amounts of NK (2.2%) and B cells (0.7%). The mean relative content of minor subpopulations (DN or DP T cells, and NKT cells) was, respectively, 5.3, 4.0, and 9%. Age dependence was revealed for the contents of major and minor lymphocyte subsets. With advancing age of the children, the relative numbers of $CD3^+T$ and $CD4^+Th$ cells in CSF increase, as well as $CD4/CD8$ ratio, associated with decreased share of NK cells, like as DN and $CD3^+CD8^{dim}T$ cells. The results obtained are reflect some features of lymphocyte pool in CSF of the children without inflammatory process in CNS. Thus, they may be referred as control values (inflammation-free brain disorders) when studying immune pathogenesis of neuroinfections and other inflammatory diseases of CNS in the children from different age groups.

Keywords: flow cytometry, immunophenotyping, lymphocytes, cerebrospinal fluid, respiratory viral infections, meningism, children

Введение

Актуальность изучения интратекального клеточного иммунного ответа на инфекции центральной нервной системы (ЦНС) обусловлена ограниченностью имеющихся сведений о механизмах иммунной защиты мозга в норме и патологии. Особый интерес представляет исследование состава пула лимфоцитов cerebrospinalной жидкости (ЦСЖ) у пациентов с подозрением на инфекционное поражение мозга, не подтвержденным проведенным обследованием. К числу таких заболеваний относятся острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), протекающие с синдромом менингизма. Диагностическая люмбальная пункция в таких случаях остается решающим фактором для исключения менингита при нормальном уровне общего белка и цитолиза в ликворе.

Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов крови позволяет выявлять нарушения функций иммунной системы и в настоящее время используется для диагностики и изучения иммунопатогенеза различных заболеваний, включая инфекционные. В то же время исследование состава лимфоцитов ЦСЖ представляет определенные сложности, в связи с чем в современной литературе сведения о нем немногочисленны. Затруднения обусловлены небольшим количеством клеток и быстрой их гибелью при извлечении ликвора, что может приводить к артефактам, препятствуя получению объективных данных. Использование в клинической лабораторной диагностике метода многоцветной проточной цитометрии (ПЦ), усовершенствование технологии подготовки проб существенно улучшили результаты анализа клеточного состава ЦСЖ [13] и позволили охарактеризовать субпопуляционный состав лимфоцитов ликвора при ряде заболеваний ЦНС, включая инфекционные [1, 2, 5, 11].

Существенной проблемой остается получение референсных значений субпопуляционного состава лимфоцитов ЦСЖ. Так, Alvermann S. и соавт., подчеркивая важность иммунофенотипирования субпопуляций лимфоцитов ЦСЖ при изучении патогенеза воспалительных заболеваний мозга, констатируют, что в большинстве публикаций отсутствуют контрольные физиологические параметры [5]. Действительно, в литературе имеются лишь единичные работы, посвященные исследованию состава пула лимфоцитов с помощью ПЦ у практически здоровых взрослых доноров. В исследовании Svenningsson A. и соавт. приведены данные фенотипирования пула лимфоцитов ЦСЖ 18 здоровых доноров в возрасте от 22 до 32 лет [14]. Установлено доминирование CD3⁺Т-клеток (97%) при небольшом количестве CD3-негативных популяций: нормальных килле-

ров (NK) и В-лимфоцитов. В работе de Graaf M. T. и соавт. методом ПЦ определены значения абсолютного содержания лейкоцитов в образцах ЦСЖ, полученных при проведении спинальной анестезии у 84 взрослых пациентов без неврологических заболеваний [9]. Авторами также установлено доминирование CD3⁺Т-клеток, среди которых преобладали CD4⁺Т-хелперы (Th), при относительно содержании В-клеток менее 1%. В исследовании Балмасовой И. П. и соавт. при изучении патогенеза острых нейроинфекций в качестве группы сравнения были использованы данные фенотипирования лимфоцитов ЦСЖ 32 условно здоровых взрослых пациентов без воспалительных изменений в ЦСЖ [2]. В данной работе авторами также обнаружено превалирование в ЦСЖ Т-клеток (в среднем 83,2%) при относительно высоком содержании NK- (8,95%) и В-клеток (5%). Исследование ликвора у практически здоровых детей невозможно из-за строго ограниченных показаний к спинномозговой пункции.

Помимо основных субпопуляций (CD3⁺Т-клетки, CD4⁺Th, CD8⁺CTL, CD3⁺CD16⁺CD56⁺NK, В-клетки), в настоящее время исследуют патогенетическое и диагностическое значение малых субпопуляций лимфоцитов, таких как CD3⁺CD16⁺CD56⁺NKT (Natural killer T cells), CD3⁺CD4⁺CD8⁺DN (Double Negative) и CD3⁺CD4⁺CD8⁺DP (Double Positive) Т-лимфоциты, и других, с особым фенотипом и функциями [4]. У DP-лимфоцитов установлен цитотоксический потенциал [12] и иммуносупрессорная активность [8]. DN Т-лимфоциты в зависимости от фенотипа также проявляют разнонаправленные функции — от усиления до супрессии антиген-специфического Т-клеточного ответа [7]. На основе интенсивности флуоресценции установлена гетерогенность популяции экспрессирующих CD8 Т-клеток — с высокой (CD8^{bright}) и низкой (CD8^{dim}) интенсивностью, при этом CD3⁺CD8^{bright} составляют около 80% всей популяции CD3⁺CD8⁺Т-клеток [6]. CD3⁺CD8^{dim}Т-лимфоциты отличаются от CD3⁺CD8^{bright} меньшей эффективностью в элиминации вируса, что показано на примере острой HIV-инфекции у взрослых [10]. Кроме CD8⁺CTL, корецептор CD8 могут экспрессировать с низкой интенсивностью CD3⁺ лимфоциты (CD3⁺CD8^{dim}), которые одновременно экспрессируют маркеры NK CD16 и CD56, что позволяет рассматривать эти клетки как одну из субпопуляций NK [6]. В доступной нам литературе данных исследования основных и малых субпопуляций лимфоцитов в ЦСЖ у детей без патологии ЦНС обнаружено не было.

Цель настоящей работы — охарактеризовать субпопуляционный состав лимфоцитов цере-

броспинальной жидкости детей с ОРВИ без менингита для получения базисных (контрольных) значений в диагностике воспалительных заболеваний ЦНС.

Материалы и методы

Проведено однократное (в острый период) клинико-лабораторное обследование ЦСЖ 27 детей (13 мальчиков, 14 девочек) в возрасте от 2 до 18 лет с диагнозом «ОРВИ с синдромом менингизма». Спинномозговую пункцию проводили в большинстве случаев на 1-4-й ($n = 21$), реже на 5-10-й ($n = 6$) день от начала болезни.

Стандартное исследование ликвора включало определение общего белка и цитоза с дифференциацией на моно- и полинуклеарные лейкоциты (реагенты Диахим-Ликвор, НПФ Абрис⁺, Санкт-Петербург). Иммунофенотипирование лимфоцитов ЦСЖ осуществляли на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Beckton Dickinson, BD, США) с использованием программы MultiSET (BD) в автоматическом режиме. Образцы ликвора центрифугировали в течение 5 минут при 1800 об/мин на центрифуге Heraeus Labofuge 300 (Германия) и ресуспендировали осадок в 100 мкл ЦСЖ. Для исследования субпопуляционного состава ($CD3^+T$ -клетки, $CD3^+CD4^+T$ -хелперы (Th), $CD3^+CD8^+$ цитотоксические Т-клетки (CTL), $CD3^+CD4^-CD8^-$ (DN), $CD3^+CD4^+CD8^+$ (DP), $CD3^+CD8^{bright}$, $CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^+CD16^+CD56^+$ (NKT), $CD3^-CD8^+NK$, $CD3^-CD16^+CD56^+NK$, $CD3^-CD19^+B$ -клетки) использована тест-система BD MultiTEST IMK Kit (cat. № 350503). Относительное содержание субпопуляций рассчитано из числа всех лимфоцитов ЦСЖ с применением программного обеспечения Microsoft Excel. Абсолютное содержание субпопуляций лимфоцитов рассчитывали согласно данным цитоза, принимая количество мононуклеарных клеток за 100%. Статистическая обработка данных выполнена с использованием стандартной программы GraphPad Prism 5. Результаты представлены в виде медианы и межквартильного размаха — Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для оценки достоверности различий выборки использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. При проведении корреляционного анализа применяли коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты

Результаты стандартного анализа ЦСЖ не выявили отклонений от общепринятых возрастных норм [3], что позволило исключить наличие менингита. Медиана и межквартильный размах содержания общего белка составили 0,20 (0,14–0,28) г/л, цитоза — 2,0 (1,3–2,9) кл/мкл.

Для комплексной оценки основных и малых субпопуляций лимфоцитов ЦСЖ обработка данных выполнена в программе FlowJo в алгоритме, представленном на рисунке 1. На основе экспрессии CD45 и параметра бокового светорассеяния (SSC) выделяли область « $CD45^{+++}$ », соответствующую по структуре и размерам лимфоцитам (рис. 1А). Далее на основе параметра бокового (SSC) и прямого (FSC) светорассеяния среди клеток области « $CD45^{+++}$ » отделяли область «Lymphocytes», соответствующую скоплению одиночных клеток (рис. 1Б). В рамках популяции «Lymphocytes» выделяли $CD3^+T$ -клетки (правый пик гистограммы, рис. 1В) и $CD3^-$ лимфоциты (левый пик гистограммы, рис. 1В). Среди Т-клеток на основе экспрессии CD4 и CD8 выделяли $CD4^+Th$ (правый нижний квадрант, рис. 1Г), $CD8^+CTL$ (верхний левый квадрант, рис. 1Г), DP (правый верхний квадрант, рис. 1Г) и DN (левый нижний квадрант, рис. 1Г). Для разделения субпопуляции клеток, экспрессирующих CD8, использовали маркеры CD3 и CD8: $CD3^+CD8^{bright}$, $CD3^+CD8^{dim}$ (правый верхний квадрант, рис. 1Д) и $CD3^-CD8^+NK$ (левый верхний квадрант, рис. 1Д). Субпопуляции NK (левый верхний квадрант, рис. 1Е) и NKT (правый верхний квадрант, рис. 1Е) выделяли на основе экспрессии CD3 и $CD16^+CD56$. В-клетки выделяли на основе экспрессии CD19 (левый верхний квадрант, рис. 1Ж).

Анализ относительного содержания в ЦСЖ основных субпопуляций выявил доминирование Т-лимфоцитов и субпопуляции $CD4^+Th$ над $CD8^+CTL$, а также малое количество НК- и В-лимфоцитов, составлявшее в сумме в среднем менее 3% от общего числа лимфоцитов (табл. 1), что согласуется с данными, полученными при исследовании ликвора практически здоровых взрослых [9, 14]. Среди субпопуляций $CD8^+CTL$ $CD3^+CD8^{bright}$ преобладали над Т-клетками, экспрессирующими CD8 с низкой интенсивностью — $CD3^+CD8^{dim}$ (см. табл. 1). Изучение малых субпопуляций показало, что относительное содержание ряда из них в условно нормальном ликворе выше, чем содержание двух основных субпопуляций (В-клеток и NK). Так, число NKT-клеток в среднем составляло 9%, DN Т-лимфоцитов — 5,3%, а DP Т-лимфоцитов — 4,0%. Очевидно, полученные результаты свидетельствуют о значимой роли субпопуляций NKT, DN и DP Т-клеток для поддержания интрацеребрального иммунного гомеостаза в условиях ОРВИ у детей.

Выявлен значительный разброс относительного содержания всех исследованных субпопуляций. Так, доля $CD4^+Th$ колебалась в широком диапазоне от 22,9% (min) до 86,1% (max) от числа

всех лимфоцитов, а $CD8^+CTL$ — от 11,1% (min) до 67,8% (max). При расчете индивидуального коэффициента соотношения Th/CTL ($CD4/CD8$) установлено, что в абсолютном большинстве случаев в ЦСЖ превалировали Th, и только в 2 случаях (7,4%) CTL преобладали над Th. Среди исследованных образцов ЦСЖ в двух случаях выявлено увеличение содержания NK- и В-клеток (в сумме выше 10%) с соответствующим снижением числа Т-лимфоцитов (< 90%). Дисперсия содержания большинства исследованных субпопуляций лимфоцитов ликвора у детей обследованной группы может отражать возрастные

особенности функционирования иммунной системы мозга.

В связи с этим был проведен корреляционный анализ показателей относительного и абсолютного содержания субпопуляций лимфоцитов с возрастом пациентов. Обнаружена достоверная положительная корреляция между возрастом и относительным содержанием в ЦСЖ $CD3^+T$ -клеток ($r = 0,442$; $p = 0,021$) и $CD4^+Th$ ($r = 0,615$; $p = 0,001$), в том числе с абсолютным количеством $CD4^+Th$ ($r = 0,472$; $p = 0,013$), тогда как с относительным содержанием $CD8^+CTL$ выявлена отрицательная связь ($r = -0,449$; $p = 0,019$).

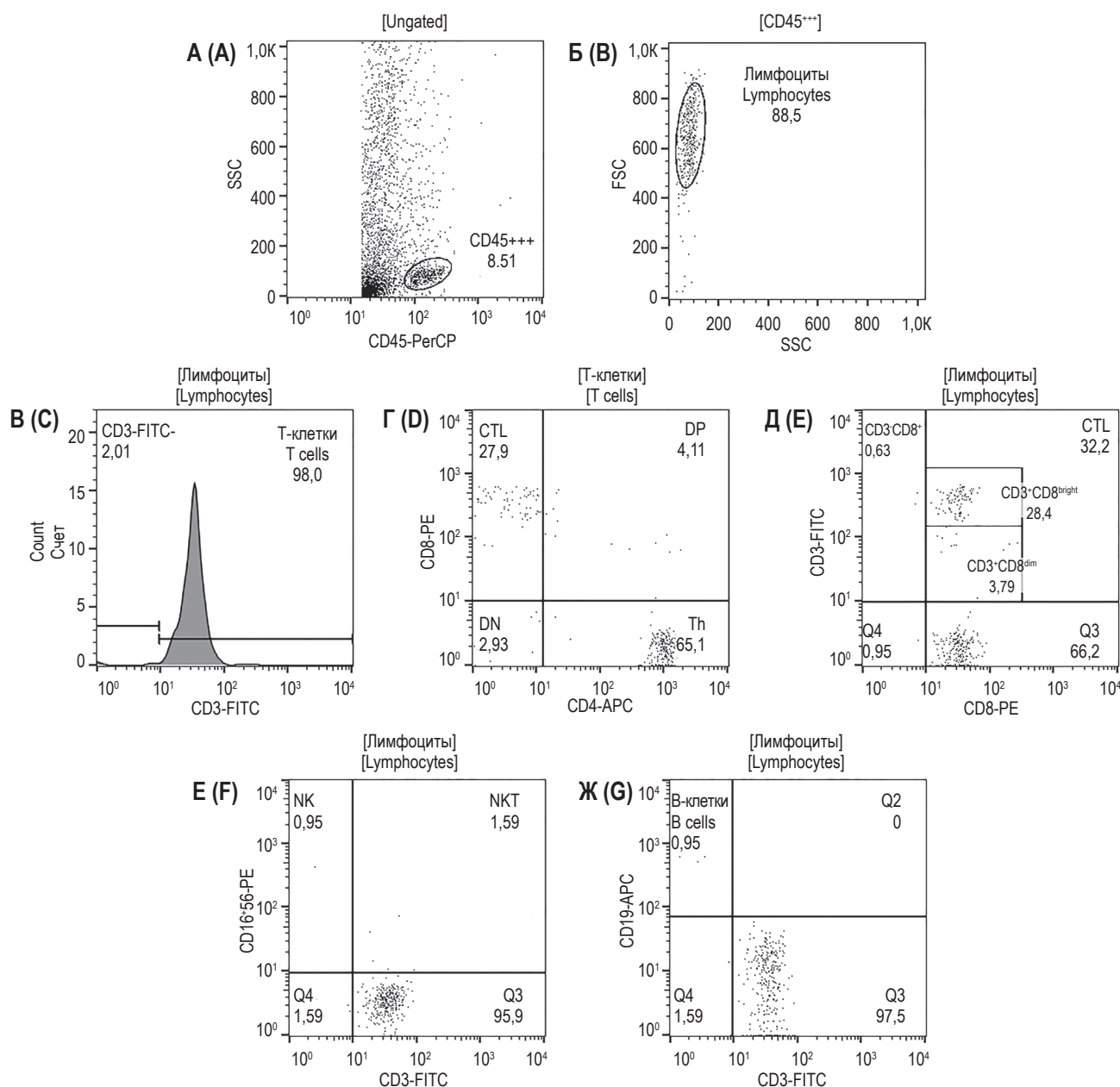


Рисунок 1. Последовательность выделения основных и малых субпопуляций лимфоцитов (подробное описание в тексте)

Figure 1. Isolation sequence of major and minor lymphocyte subpopulations (detailed description is given in the text)

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ И АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ С СИНДРОМОМ МЕНИНГИЗМА, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. RELATIVE AND ABSOLUTE CONTENT OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN CEREBROSPINAL FLUID OF CHILDREN WITH ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTION TAKING THE COURSE WITH THE SYNDROME OF MENINGISM, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Основные и малые субпопуляции Major and minor subpopulations	Содержание Content	
	Относительное количество Relative content (%)	Абсолютное количество ($10^6/л$) Absolute amount ($10^6/l$)
Т-клетки T cells (CD3 ⁺ CD45 ⁺)	96,2 (94,3-97,6)	1,6 (0,9-2,0)
Th (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺)	53,4 (47,0-61,6)	0,8 (0,4-1,2)
CTL (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺)	28,2 (20,1-34,8)	0,4 (0,2-0,7)
CD3 ⁺ CD8 ^{bright} CD45 ⁺	23,8 (16,0-33,6)	0,38 (0,21-0,66)
CD3 ⁺ CD8 ^{dim} CD45 ⁺	7,3 (5,1-12,9)	0,11 (0,07-0,19)
DN (CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD45 ⁺)	5,3 (2,4-8,2)	0,05 (0,04-0,16)
DP (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺)	4,0 (2,8-7,9)	0,06 (0,04-0,10)
NKT (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺ CD45 ⁺)	9,3 (5,9-16,9)	0,16 (0,05-0,24)
NK (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻ CD45 ⁺)	2,2 (1,0-3,1)	0,03 (0,01-0,05)
CD3 ⁻ CD8 ⁺ CD45 ⁺ NK	0,3 (0,0-1,2)	0,01 (0,00-0,01)
В-клетки B cells (CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD45 ⁺)	0,7 (0,2-1,7)	0,01 (0,00-0,03)
Th/CTL	2,0 (1,5-2,6)	—

Коэффициент Th/CTL (CD4/CD8) прямо коррелировал с возрастом детей ($r = 0,525$; $p = 0,005$). Прослеживалась сильная отрицательная корреляция с возрастом числа (%) CD4⁺CD8⁻DN Т-лимфоцитов ($r = -0,634$; $p = 0,0001$), а также всех CD3⁺ клеток ($r = -0,444$; $p = 0,020$) и NK ($r = -0,512$; $p = 0,006$). Таким образом, с возрастом у детей, переносящих ОРВИ, среди лимфоцитов ЦСЖ нарастает доля CD3⁺Т-клеток и CD4⁺Th (как и соотношение CD4/CD8) с уменьшением числа CD8⁺CTL. Снижается также доля CD4⁺CD8⁻DN Т-клеток, а также CD3⁺ клеток за счет NK (но не В-лимфоцитов).

Результаты корреляционного анализа явились основанием для разделения детей на 3 группы по возрасту, согласно общепринятой классификации возрастных периодов развития человека

(табл. 2). Полученные результаты показали рост субпопуляции CD3⁺CD8^{bright} и тенденцию к росту субпопуляции DP Т-лимфоцитов ($p = 0,054$) при, напротив, снижении содержания CD3⁺CD8^{dim} и DN Т-лимфоцитов у детей раннего школьного возраста (6-11 лет, 2-я группа) в сравнении с детьми дошкольного возраста (2-5 лет, 1-я группа). Анализ показателей у детей подросткового возраста (12-18 лет, 3-я группа) выявил тенденцию к повышенному содержанию в ЦСЖ CD3⁺Т-лимфоцитов ($p = 0,06$) и CD4⁺Th ($p < 0,05$) в сравнении с детьми 1-й и 2-й групп. Доля CD3⁺CD8^{bright} у подростков оказалась сопоставима с показателями в 1-й группе и заметно снижена в сравнении со 2-й ($p = 0,068$). Соотношение CD4⁺Th/CD8⁺CTL у детей 3-й группы выше, чем у детей 1-й группы ($p < 0,05$) и, возможно, 2-й ($p = 0,08$).

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ И МАЛЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ С СИНДРОМОМ МЕНИНГИЗМА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. RELATIVE CONTENT OF MAJOR AND MINOR LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN CEREBROSPINAL FLUID OF CHILDREN WITH ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS WITH THE SYNDROME OF MENINGISM DEPENDING ON THE AGE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Основные и малые субпопуляции Major and minor subpopulations	Содержание Content		
	1 группа 2-5 лет 1 st group 2-5 years n = 7	2 группа 6-11 лет 2 nd group 6-11 years n = 9	3 группа 12-18 лет 3 rd group 12-18 years n = 11
Т-клетки T cells (CD3 ⁺ CD45 ⁺)	95,5 (90,5-96,3)	95,1 (92,7-96,3)	97,2 (94,8-98,2)
Th (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺)	51,8 (40,2-53,1)	51,1 (40,8-57,9)	61,4* ** (53,8-73,0)
CTL (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺)	33,6 (25,8-36,3)	31,8 (24,8-36,1)	24,3 (14,8-30,2)
CD3 ⁺ CD8 ^{bright} CD45 ⁺	20,8 (12,3-27,9)	30,0* (22,8-42,0)	23,8 (15,3-33,6)
CD3 ⁺ CD8 ^{dim} CD45 ⁺	12,4 (9,0-13,6)	7,1* (4,8-8,9)	7,1 (4,3-14,9)
DN (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺)	10,7 (8,8-14,6)	5,4* (4,7-7,0)	3,0* (1,6-5,4)
DP (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺)	2,8 (1,9-4,0)	6,1 (3,6-10,8)	3,8 (3,1-9,1)
NKT (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺ CD45 ⁺)	11,9 (7,7-16,3)	7,2 (5,6-14,6)	8,9 (3,0-19,6)
NK (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺ CD45 ⁺)	3,1 (2,2-6,8)	2,9 (0,6-3,2)	1,5* (1,0-2,1)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ NK	1,1 (0,2-1,3)	0,3 (0,0-1,0)	0,5 (0,0-1,0)
В-клетки B cells (CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD45 ⁺)	1,0 (0,5-1,7)	1,0 (0,3-4,1)	0,46 (0,06-1,61)
Th/CTL	1,46 (1,04-2,23)	1,51 (1,18-2,33)	2,45* (1,75-5,01)

Примечание. * – отличие от показателей 1-й группы, ** – отличие от показателей 2-й группы (уровень достоверности $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Note. *, difference from the indicators of the 1st group; **, difference from the indicators of the 2nd group (confidence level $p < 0.05$, Mann-Whitney test).

Кроме того, в ЦСЖ детей 3-й группы достоверно ниже содержание NK и DN Т-лимфоцитов в сравнении с детьми 1-й, а DN, по-видимому, и с детьми 2-й группы ($p = 0,059$). Анализ абсолютного содержания клеток всех субпопуляций показал, что в ЦСЖ детей раннего школьного и подросткового возраста (2-я и 3-я группы) количество DP Т-лимфоцитов достоверно выше, чем у детей младшей (1-й) группы, а пул CD4⁺Th у подростков заметно больше, чем у детей младше 12 лет ($p = 0,057$ при сравнении с 1-й группой).

Обсуждение

Инtrateкальный пул лимфоцитов представляет собой важный фактор в обеспечении гомеостаза мозга в норме и при патологии. Мозг обладает собственными защитными механизмами, одним из которых является наличие в ЦСЖ иммунокомпетентных клеток, включая Т-лимфоциты [14]. В настоящей работе подробно охарактеризован субпопуляционный состав лимфоцитов ЦСЖ у детей с ОРВИ без вовлечения ЦНС. Помимо

оценки основных субпопуляций, давно и прочно вошедших в практику клинической лабораторной диагностики, проведена оценка относительного и абсолютного содержания малых субпопуляций с помощью дополнительного алгоритма гейтирования (gating) с использованием программы FlowJo. Полученные результаты частично согласуются с данными литературы о составе лимфоцитов ЦСЖ у практически здоровых взрослых либо пациентов без заболеваний ЦНС [9, 14]. В то же время выявлены некоторые отличия. В частности, соотношение Th/CTL лимфоцитов у здоровых доноров было несколько выше (3,16) [14] в сравнении с полученным в настоящем исследовании (2,0). Соотношение Th/CTL в работе Балмасовой И.П. и соавт. было еще более смещено в сторону Th (коэффициент составлял около 4) [2], что сопоставимо с результатами Svenningsson A. и соавт. [14] и в 2 раза выше значения, полученного в настоящем исследовании (см. табл. 1). По-видимому, превалирование CD4⁺Th над CD8⁺CTL в ЦСЖ усиливается с возрастом, что показано нами в возрастном интервале от 2 до 18 лет (см. табл. 2). Содержание NKT в ликворе детей с ОРВИ составляло в среднем 9% (см. табл. 1), что превышает колебания числа NKT в ЦСЖ практически здоровых взрослых (от 2,7 до 4,2%) [14].

Выявленные возрастные особенности содержания в ЦСЖ основных (CD4⁺Th, NK) и малых (CD3⁺CD8^{bright}, CD3⁺CD8^{dim}, DN Т-лимфоциты) субпопуляций лимфоцитов, по-видимому, отражают этапы созревания иммунной системы

мозга. Для детей младшего возраста, переносящих ОРВИ, характерно присутствие в ЦСЖ большего числа клеток врожденного иммунитета (NK, CD3⁺CD8⁺NK), а также клеток переходного фенотипа (DN и CD3⁺CD8^{dim}). С возрастом содержание этих клеток в ЦСЖ уменьшается, и, по-видимому, у детей подросткового возраста показатели становятся сопоставимыми с таковыми у практически здоровых взрослых.

Заключение

Таким образом, использование многоцветной проточной цитометрии позволило охарактеризовать субпопуляционный состав лимфоцитов ЦСЖ детей, переносящих ОРВИ с синдромом менингизма. Благодаря использованному алгоритму гейтирования установлено относительное и абсолютное содержание в ликворе как основных, так и малых субпопуляций лимфоцитов, что способствует расширению представлений о роли различных субпопуляций в осуществлении иммунной защиты мозга при острых вирусных инфекциях. Полученные данные могут быть использованы в качестве контроля (отсутствие признаков воспаления в ЦСЖ) при изучении иммунопатогенеза нейроинфекций и других воспалительных заболеваний ЦНС у детей разных возрастных групп.

Благодарности

Работа выполнена при частичной поддержке гранта Комитета по науке и высшей школе правительства Санкт-Петербурга в 2017 году.

Список литературы / References

1. Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Жирков А.А., Скрипченко Н.В., Вильниц А.А., Монахова Н.Е., Бессонова Т.В. Субпопуляции лимфоцитов и цитокины в крови и цереброспинальной жидкости при вирусных и бактериальных менингитах у детей // Инфекция и иммунитет, 2016. Т. 6, № 1. С. 33-44. [Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Zhirkov A.A., Skripchenko N.V., Vilnits A.A., Monakhova N.E., Bessonova T.V. Lymphocyte subsets and cytokines in blood and cerebrospinal fluid in children with viral and bacterial meningitis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, Vol. 6, no. 1, pp. 33-44. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2016-1-33-44.
2. Балмасова И.П., Венгеров Ю.Я., Раздобарина С.Е., Нагибина М.В. Иммунопатогенетические особенности бактериальных гнойных менингитов // Эпидемиология и инфекционные болезни, 2014. Т. 19, № 5. С. 17-22. [Balmasova I.P., Vengerov Yu.Ya., Razdobarina S.E., Nagibina M.V. Immunopathogenetic features of bacterial purulent meningitides. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2014, Vol. 19, no. 5, pp. 17-22. (In Russ.)]
3. Скрипченко Н.В., Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф. Ликвор и его клиническое значение при инфекционных заболеваниях нервной системы // Педиатр, 2011. Т. 2, № 3. С. 21-31. [Skripchenko N.V., Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F. Liquor and its clinical meaning in infectious diseases of nervous system. *Pediatr = Pediatrician*, 2011, Vol. 2, no. 3, pp. 21-31. (In Russ.)]
4. Хайдуков С.В., Байдун Л.В. Современные подходы к оценке клеточной составляющей иммунного статуса // Медицинский алфавит, 2015. Т. 2, № 8. С. 44-51. [Khaidukov S.V., Baydun L.V. Modern approach to assessing cellular constituents immune status. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2015, Vol. 2, no. 8, pp. 44-51. (In Russ.)]
5. Alvermann S., Hennig C., Olaf S., Heinz W., Stangel M. Immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in multiple sclerosis in search of biomarkers. *JAMA Neurology*, 2014, Vol. 71, no. 7, pp. 905-912.

6. Campbell J.P., Guy K., Cosgrove C., Florida-James G.D., Simpson R.J. Total lymphocyte CD8 expression is not a reliable marker of cytotoxic T-cell populations in human peripheral blood following an acute bout of high-intensity exercise. *Brain. Behav. Immun.*, 2008, Vol. 22, no. 3, pp. 375-380.
7. d'Acquisto F., Crompton T. CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? *Biochem. Pharmacol.*, 2011, Vol. 82, no. 4, pp. 333-340.
8. Das G., Augustine M. M., Das J., Bottomly K., Ray P., Ray A. An important regulatory role for CD4⁺CD8 $\alpha\alpha$ T cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of inflammatory bowel disease. *PNAS*, 2003, Vol. 100, no. 9, pp. 5324-5329.
9. de Graaf M.T., Smitt P.A., Luitwieler R.L., van Velzen C., van den Broek P.D., Kraan J., Gratama J.W. Central memory CD4⁺T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2011, Vol. 80, no. 1, pp. 43-50.
10. Eller M.A., Goonetilleke N., Tassaneetrithep B., Eller L.A., Costanzo C., Johnson S., Betts M.R., Krebs S.J., Slike B.M., Nitayaphan S., Rono K., Tovanabutra S., Maganga L., Kibuuka H., Jagodzinski L., Peel S., Rolland M., Marovich M.A., Kim J.H., Michael N.L., Robb M.L., Streeck H. Expansion of inefficient HIV-specific CD8⁺ T cells during acute infection. *J. Virol.*, 2016, Vol. 90, no. 8, pp. 4005-4016.
11. Ichiyama T., Kajimoto M., Matsushige T., Shiraishi M., Suzuki Y., Furukawa S. Mononuclear cell subpopulations in CSF and blood of children with bacterial meningitis. *J. Infect.*, 2009, Vol. 58, no. 1, pp. 28-31.
12. Kitchen S.G., Jones N.R., LaForge S., Whitmire J.K., Vu B.A., Galic Z., Brooks D.G., Brown S.J., Kitchen C.M., Zack J.A. CD4 on CD8⁺ T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection. *PNAS*, 2004, Vol. 101, no. 23, pp. 8727-8732.
13. Subirá D., Castañón S., Aceituno E., Hernández J., Jiménez-garófano C., Jiménez A., Jiménez A.M., Román A., Orfao A. Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2002, Vol. 117, no. 6, pp. 952-958.
14. Svenningsson A., Andersen O., Edsbacke M., Stemme S. Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid. *J. Neuroimmunol.*, 1995, Vol. 63, no 1, pp. 39-46.

Авторы:

Жирков А.А. — младший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Алексеева Л.А. — д.б.н., руководитель, ведущий научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Железникова Г.Ф. — д.м.н., профессор, старший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Zhirkov A.A., Junior Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Alekseeva L.A., PhD, MD (Biology), Head, Leading Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Zheleznikova G.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Монахова Н.Е. — научный сотрудник отдела
клинической лабораторной диагностики ФГБУ
«Детский научно-клинический центр инфекционных
болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Бессонова Т.В. — научный сотрудник отдела
клинической лабораторной диагностики ФГБУ
«Детский научно-клинический центр инфекционных
болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Monakhova N.E., Research Associate, Department of Clinical
Laboratory Diagnostics, Pediatric Research and Clinical
Center for Infectious Diseases, Federal Medical-Biological
Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Bessonova T.V., Research Associate, Department of Clinical
Laboratory Diagnostics, Pediatric Research and Clinical
Center for Infectious Diseases, Federal Medical-Biological
Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 10.04.2019
Принята к печати 06.05.2019

Received 10.04.2019
Accepted 06.05.2019

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В МЕХАНИЗМАХ ИММУННОЙ ДИСРЕГУЛЯЦИИ И ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Давыдова Е.В.¹, Зурочка А.В.^{2,3}, Зурочка В.А.^{2,3}, Альтман Д.Ш.¹

¹ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

³ ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Резюме. Известно, что иммунологический компонент практически любой дисрегуляторной патологии проявляется формированием новых функциональных систем, обеспечивающих адаптационные реакции, а также наличием аллостаза, отражающего иные, отличные от нормы формы и варианты взаимоподдерживающих связей, возникающих на разных структурно-функциональных уровнях организма. Длительное пребывание на театре военных действий неизбежно оказывает свое негативное влияние на процессы реадaptации к мирной жизни и сопровождается появлением патологических функциональных связей, приводящих к нарушению регуляции основных функций и систем, в том числе нервной и иммунной. В связи с этим нами изучены особенности функционирования иммунных клеток у пациентов с ранними формами хронической ишемии мозга в условиях гиперлипидемии, проведена комплексная оценка факторов, характеризующих морфологическое и функциональное состояние эндотелия. Проведено комплексное обследование 87 пациентов, принимавших участие в Афганской кампании с ранними формами недостаточности мозгового кровообращения. Исследуемые имели объективные и субъективные признаки основного сосудистого заболевания, характерные для самых ранних проявлений хронической цереброваскулярной недостаточности, в виде головной боли, головокружения, шума в голове, нарушений памяти, снижения работоспособности. Всем пациентам проведено комплексное обследование: развернутая липидограмма, определение вазоактивных факторов в крови и культуральной жидкости, количество циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов, характеризующее морфологические признаки повреждения эндотелия, дополнительно проводилась ультразвуковая доплерография магистральных сосудов, транскраниальная доплерография и электроэнцефалография.

Известно, что клетки эндотелия самостоятельно способны модулировать тонус сосудов в зависимости от текущей ситуации, а также могут быть подвергнуты ремоделирующим перестройкам при вовлечении в патологический процесс, например атероматоз. В связи с этим ключевым фактором развития сосудистой патологии, затрагивающим системный уровень, является дисфункция эндотелия. По результатам исследования установлено, что основным механизмом прогрессирования ран-

Адрес для переписки:

Давыдова Евгения Валерьевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет»
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (908) 060-92-06.
E-mail: dav-zhenya@yandex.ru

Address for correspondence:

Davydova Eugenia V.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (908) 060-92-06.
E-mail: dav-zhenya@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.В. Давыдова, А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Д.Ш. Альтман «Роль нарушений липидного обмена в механизмах иммунной дисрегуляции и дисфункции эндотелия при ранних формах хронической цереброваскулярной недостаточности» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1043-1054.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1043-1054
© Давыдова Е.В. и соавт., 2019

For citation:

E.V. Davydova, A.V. Zurochka, V.A. Zurochka, D.S. Altman "Role of lipid metabolic disturbances for the mechanisms of immune dysregulation and endothelial dysfunction in early forms of chronic cerebrovascular insufficiency", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1043-1054.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1043-1054
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1043-1054

них форм ХЦВН является развитие эндотелиальной дисфункции, в мультифакторном генезе которой принимают непосредственное участие и иммунные механизмы. Гиперлипидемия, наличие которой установлено более чем в 90% случаев, является одним из важнейших метаболических пусковых факторов развития иммунных реакций, чему способствует также дисбаланс вазоформных и тромбогенных факторов, наличие маркеров оксидативного и нитрозативного клеточного стресса, в целом способствующих нарастанию явлений церебрального сосудистого ремоделинга и лежащих в основе формирования органической патологии ЦНС.

Ключевые слова: начальные проявления недостаточности кровоснабжения мозга, гиперлипидемия, моноциты, эндотелиальная дисфункция

ROLE OF LIPID METABOLIC DISTURBANCES FOR THE MECHANISMS OF IMMUNE DYSREGULATION AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY

Davydova E.V.^a, Zurochka A.V.^{b,c}, Zurochka V.A.^{b,c}, Altman D.S.^a

^a South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

^c South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. It is known that the immunological component of nearly any dysregulatory pathology is manifested by the development of new functional systems providing adaptation reactions, as well as by the presence of allostasis, reflecting other forms that are different from the normal parameters, and variants of mutually supporting relationships that occur at different structural and functional levels of the body. A long stay in the areas of military campaigns inevitably has a negative impact on the re-adaptation for civilian life, and it is accompanied by occurrence of pathological functional connections that lead to dysregulation of the basic functions, including those of nervous and immune systems. In this regard, we studied the features of immune cell functioning in the patients with early forms of chronic cerebral ischemia accompanied by hyperlipoproteinemia, and we have made a comprehensive assessment of the factors characterizing morphological and functional state of endothelium. A representative survey included 87 patients who participated in the Afghan campaign with early forms of cerebral circulatory failure. The subjects exhibited objective and subjective signs of underlying vascular disease, typical to the earliest manifestations of chronic cerebrovascular insufficiency (CVVN) manifesting as headache, dizziness, noise in the head, memory impairment, decreased performance. All the patients underwent a comprehensive examination, i.e., expanded lipidogram, determination of vasoactive factors in the blood and cultural fluid, the number of circulating desquamated endotheliocytes, thus reflecting morphological signs of endothelial damage, additional ultrasound Doppler sonography of the main vessels, transcranial Doppler and electroencephalography were carried out.

It is known that endothelial cells are independently capable of modulating vascular tone, depending on the current clinical condition, and it may be also subjected to remodeling rearrangements with involvement into the pathological process, e.g., in atheromatosis. In this regard, endothelial dysfunction is a key factor in developing vascular pathology, affecting the systemic level. According to results of the study, it has been established that the main progression mechanism for the early forms of CVVN is the development of endothelial dysfunction. The condition has multifactorial genesis in which immune mechanisms are directly involved. Hyperlipoproteinemia established in more than 90% of cases, is one of the most important metabolic triggering factors for development of immune reactions, which is also promoted by imbalance of vasoform and thrombogenic factors, by presence of oxidative and nitrosative cellular stress markers which generally contribute to increase in cerebral vascular remodeling and the basis for the formation of organic pathology of the central nervous system.

Keywords: brain blood supply, early insufficiency, hyperlipidemia, monocytes, endothelial dysfunction

Введение

Современные представления о патогенезе практически любой нозологической формы включают рассмотрение механизмов системной и локальной иммунной дисрегуляции. Формирование ранних форм недостаточности мозгового кровообращения также следует изучать с позиций нейроиммунного взаимодействия. Формирование новой адаптационной системы сопровождается формированием изменений конструкции функциональных связей и систем аллостатической направленности [9]. Военный стресс неизбежно оказывает свое негативное влияние на процессы реадаптации к мирной жизни и сопровождается появлением патологических функциональных связей, приводящих к нарушению регуляции основных функций и систем, в том числе нервной и иммунной. Клиническая манифестация ранних форм хронической ишемии мозга сопровождается нарушением процессов сосудистой вазорегуляции, гипоксией нейронов и глии, нарушением нормального функционирования эндотелия церебральных сосудов на уровне микроциркуляторного русла и атероматозом магистральных сосудов, изменением реологии крови, что приводит к повреждению и повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера, и свободным обменом органоспецифических мозговых пептидов с периферическим кровотоком с неизбежным развертыванием аутоиммунных реакций на территории ЦНС и на периферии, что, в свою очередь, приводит к формированию аутоиммунного профиля реагирования иммунной системы и накоплению специфических аутоантител к антигенам мозговой ткани различной специфичности. Особая роль в реализации механизмов клеточного повреждения при церебральной ишемии принадлежит механизму глутаматной эксайтотоксичности.

Целью исследования явилась оценка влияния изменений липидного статуса крови на факторы иммунных реакций и эндотелия при ранних формах недостаточности мозгового кровообращения.

Материалы и методы

Для участия в исследовании методом простой рандомизации были отобраны 87 пациентов мужского пола (средний возраст $45,1 \pm 1,4$ года), участников военной кампании в Афганистане с ранними формами цереброваскулярной недостаточности (2 группа — основная), в контрольную группу 1 вошли 30 здоровых мужчин в возрасте 35–55 лет без субъективных и объективных проявлений цереброваскулярной патологии, имеющих показатели липидограммы в пределах

возрастной нормы. Диагноз пациентам основной группы выставлен в соответствии с классификацией сосудистых поражений головного мозга под редакцией Шмидта Е.В. (1985) [7], а также с учетом ряда клинических и инструментальных методов исследования. У всех пациентов имели место признаки основного сосудистого заболевания и набор жалоб, характерных для самых ранних проявлений хронической цереброваскулярной недостаточности, а именно: головная боль, головокружение, шум в голове, нарушение памяти, снижение работоспособности. Всем пациентам проводились дополнительные методы нейровизуализации, ультразвуковая доплерография магистральных сосудов, транскраниальная доплерография и электроэнцефалография. В качестве материала для исследования использовали венозную кровь, собранную натощак.

Оценка показателей развернутой липидограммы

В качестве базового документа для сравнения показателей липидного спектра использовали рекомендации Национальной образовательной программы по холестерину (National Cholesterol Education Program, NCEP, США, 2001) и российским рекомендациям [3]. Для определения концентрации общего холестерина, триглицеридов, холестерина в составе липопротеинов низкой и высокой плотности использовали анализатор биохимический ФП-901М фирмы Labsystems (Финляндия) с набором стандартных реагентов. Показатели выражали в ммоль/л. Используя формулы, вычисляли показатели ХС ЛПОНП и ХС ЛПНП:

$$\text{ХС ЛПОНП} = \text{ТГ} / 2,2 \text{ (ммоль/л)};$$

$$\text{ХС ЛПНП} = \text{Общий ХС} - \text{ХС ЛПВП} - \text{ХС ЛПОНП (ммоль/л)}.$$

Измерение концентрации конечных дериватов оксида азота в крови и культуральной жидкости

Продукцию оксида азота в сыворотке и культуральной жидкости оценивали, применяя реакцию Гриса по методу Н.Л. Емченко и соавт. (1994) [4] в модификации [6]. Оценивали содержание терминальных метаболитов оксида азота нитритов (NO_2), нитратов (NO_3) и их суммарных продуктов (NO_x). В эксперименте *in vitro* моноциты в количестве 600 тысяч клеток инкубировали в питательной среде с экспозицией в течение 1 часа и последующим определением концентрации метаболитов оксида азота.

Определение уровня эндотелина-1, нитротирозина и васкулоэндотелиального фактора роста

Для детекции уровня эндотелина-1 применяли непрямой метод ИФА, используя высокочувствительную (0,02–10 фмоль/мл) тест-систему производства Biomedica (Австрия). Нитротирозин определяли с применением набора для иммуноферментного анализа NBT Nitrotyrosine ELISA

(ЗАО «БиоХимМак»), результат выражали в нМ; уровень васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) — в пг/мл, с помощью тест-системы (eBioscience, BenderMedSystems, ЗАО «БиоХимМак»). Измерения проводили на спектрофотометре Multiscan Plus (Финляндия) при соответствующей длине волны.

Оценка адгезивной способности мононуклеаров

Выделение популяции моноцитов с определением процентного и абсолютного содержания производили на гематологическом анализаторе Coulter LH 500 фирмы Beckman Coulter (США). Параллельно применялся стандартный и спектрофотометрический метод определения адгезии мононуклеаров на пластик. При стандартном методе клетки в концентрации 2×10^6 кл/мл подвергали инкубации в стандартных условиях с последующим подсчетом в камере Горяева. Выражали в процентах. При спектрофотометрической оценке теста в лунки плоскодонного 96-луночного планшета вносили по 200 мкл клеточной суспензии в концентрации 2×10^6 кл/мл, подвергали инкубации, отмывали, фиксировали и окрашивали краской по Романовскому—Гимзе. Результат учитывали на спектрофотометре Multiscan Plus.

Определение функциональной активности мононуклеаров (бактерицидные и пролиферативные свойства)

Бактерицидные свойства фагоцитов оценивали при помощи проведения спонтанного и индуцированного МТТ-теста спектрофотометрическим методом [8]. При проведении МТТ-теста бесцветная соль тетразолия подвергается ферментативному восстановлению внутриклеточными дегидрогеназами. Кристаллы формазана растворяются в ДМСО и измеряются на спектрофотометре при длине волны 560 нм.

Исследование способности клеток к пролиферации осуществляли в стерильных условиях, для этого выделенные клетки помещали в 96-луночные планшеты, внося параллельно в лунки питательную суспензию, содержащую среду RPMI 1640, 2мМ L-глутамин и 40 мкг/мл гентамицина сульфата. После 12-часовой инкубации в лунки вносили витальный краситель AlamarBlue® (Invitrogen, США). Флуоресценцию измеряли через 4 часа на флуориметре VersaFluor (Bio-Rad) при длине волны возбуждения 390 нм, эмиссии 620 нм и выражали в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ, Relative Fluorescent Units, RFU).

Оценка уровня циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов

Проводилась согласно стандартной методике [11] с последующим подсчетом клеток в камере Горяева и на микроскопе ЛОМО Микромед-1

(Россия). Результат измеряли в клетках/100 мкл (норма: 2–4 клеток/100 мкл).

Статистическая обработка материала

Для статистической обработки материала применяли пакет прикладных программ Statistica vers. 8.0 for Windows и IBM SPSS Statistics 19. Все показатели даны в виде среднего значения (М) и среднего арифметического (m), сравнение групп производили с помощью критерия Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

Эндотелиальная выстилка сосудов — метаболически активная функциональная система, регулирует обширный спектр физиологических процессов. Клетки эндотелия способны модулировать тонус сосудов в зависимости от актуальной ситуации, могут быть подвергнуты ремоделирующим перестройкам, участвуют в процессах гемостаза, воспалении, атероматозе. Согласно современным представлениям, дисфункция эндотелия есть ключевой фактор развития сосудистой патологии, затрагивающей системный уровень. При этом сам эндотелий может подвергаться негативным воздействиям и, напротив, выступать в роли медиатора патологического процесса. Нарушение в системе липидного гомеостаза с формированием гиперлипидемического профиля крови является мощнейшим повреждающим фактором сосудистого эндотелия. При этом наиболее атерогенными признаны липопротеины низкой плотности, содержащие аполипопротеин В-100, легко проникающие и накапливающиеся в стенках сосуда.

Количественные параметры липидограммы у пациентов с ранними формами хронической цереброваскулярной недостаточности (ХЦВН) даны в таблице 1.

Нами показано, что значения показателей липидного гомеостаза у больных с ранними формами хронической цереброваскулярной недостаточности практически по всем позициям имеют значения, достоверно превышающие таковые в контрольной группе, что является актуальной предпосылкой для развития атеросклероза сосудов. Показатель общего холестерина в группе пациентов с ранними формами ХЦВН соответствовал погранично высокому (5,2–6,2 ммоль/л), что отражает умеренный тип гиперхолестеринемии. Количество триглицеридов при ХЦВН также было повышенным в сравнении с контрольной группой, однако значения в целом соответствовали показателям международной «нормы» (менее 2,3 ммоль/л). Уровень ХС в составе ЛПНП, ЛПОНП и показатель атерогенности по Климову у больных с ХЦВН соответствовали по значению погранично высокому уровню. Высокие концен-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДОГРАММЫ У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ХЦВН) ($M \pm m$)

TABLE 1. INDICATORS OF LIPID PROFILE IN PATIENTS WITH EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY ($M \pm m$)

Показатели Indicators	Группа 1 Контрольная с нормолипидемией Group 1 Control with normolipidemia n = 30	Группа 2 Вeterаны с ранними формами ХЦВН с гиперлипидемией Group 2 Veterans with early forms of chronic cerebrovascular insufficiency with hyperlipidemia n = 87	p difference confidence indicator
ОХС, ммоль/л Total cholesterol, mmol/l	4,50±0,14	5,30±0,13	< 0,01
ТГ, ммоль/л TG, mmol/l	1,27±0,12	2,17±0,13	< 0,01
ХС-ЛПВП, ммоль/л HDL, mmol/l	1,04±0,08	1,09±0,06	
ХС-ЛПНП, ммоль/л LDL, mmol/l	2,18±0,12	3,80±0,12	< 0,01
ХС-ЛПОНП, ммоль/л LPONP, mmol/l	0,53±0,02	0,98±0,05	< 0,01
КА (коэффициент атерогенности по Климову) Coefficient of atherogenicity according to Klimov	3,02±0,16	4,35±0,10	< 0,01

Примечание. p – показатель значимости различий между группами по критерию Манна–Уитни.

Note. p, an indicator of the significance of differences between groups according to the criterion of Mann–Whitney.

трации триглицеридов в сыворотке крови отражают высокий атерогенный потенциал и ассоциируются с развитием и прогрессивным течением раннего атеросклероза. [10]. Следует отметить, что показанные нами изменения содержания отдельных фракций липопротеинов в сыворотке крови показывают наличие важнейшего модифицируемого фактора риска развития системного, в том числе церебрального, атеросклероза и непосредственно связанных с ним последствий в виде острых и хронических нарушений мозгового кровотока. Литературные данные свидетельствуют, что церебральные атеросклеротические поражения характеризуются стойким повышением отдельных классов липопротеидных частиц, а именно β -липопротеинов, характерных для липопротеинов промежуточной и низкой плотности, пре- β -липопротеинов, входящих в состав липопротеинов очень низкой плотности, а также триглицеридов и полиненасыщенных жирных кислот с формированием на этом фоне ПА, ПБ и IV типов гиперлипопротеинемий, согласно классификации Фредриксона.

Также общеизвестно, что атерогенный профиль липидного обмена заключается не только

в увеличении содержания атерогенных фракций липидов, но и в снижении содержания уровня холестерина в составе липопротеинов высокой плотности.

Нами проанализированы данные о распределении различных типов гиперлипопротеинемий среди пациентов с ранними формами хронической цереброваскулярной недостаточности. Так показано, что более 30% пациентов имели ПА тип ГЛП, для которого характерно изолированное повышение общего холестерина в крови, 29% пациентов имели ПБ тип ГЛП, отражающий повышение как ТГ, так и общего холестерина, часть пациентов (28%) имела как повышение уровня ТГ, так и холестерина в составе липопротеинов очень низкой плотности, остальные пациенты с ранними формами ХЦВН имели нормальный липидный профиль сыворотки крови.

Также контрольная группа соответствовала критериям нормолипидемии. В целом 90% обследуемой группы мужчин с ранними формами хронической цереброваскулярной недостаточности показывали различные изменения спектра липидов, что в сочетании с гипертоническим поражением сосудистого русла составляет морфо-

логический субстрат для формирования хронической церебральной сосудистой патологии.

Повышение в системном кровотоке избыточного количества молекул холестерина приводит к накоплению и оксидативной модификации белкового субстрата липопротеиновой молекулы, изменению реологических свойств крови, с повышением вязкости, адгезивной активности эндотелия в виде усиленной экспрессии молекул сосудистой адгезии и активации на этом фоне тромбоцитов. Циркулирующие моноциты, реагируя на ситуацию, в свою очередь, подвергаются также активации, за счет повышения активности молекул интегринов на своей поверхности, которые являются основными детерминирующими факторами селективной инвазии сосудистой стенки при формировании атеросклеротической бляшки. Все вышеперечисленные сведения дают основание предполагать непосредственное участие моноцитов в механизмах развития атеросклеротических поражений, и в связи с этим нами исследованы функциональные возможности моноцитов у пациентов с ранними формами хронической цереброваскулярной недостаточности

сти в условиях как нормо-, так и гиперлипидемии (табл. 2).

Анализ таблицы 2 показал, что изменения липидного спектра сыворотки крови сопровождаются ростом абсолютного числа моноцитов, отражающего интенсивность моноцитопоза на уровне костного мозга, в сравнении с пациентами, имеющими нормальные показатели липидного спектра сыворотки крови. Функциональные возможности моноцитов в условиях гиперлипидемии также были изменены, в виде повышения адгезивной и пролиферативной активности клеток, отражающих активацию клетки ее выход из редокс-статуса. В варианте теста с микроскопической оценкой результатов исследования процент адгезии у лиц с ГЛП был выше на уровне статистической вероятности, а при спектрофотометрической оценке показатели оптической плотности были достоверно выше у пациентов с гиперлипидемией, что характерно для ее проявлений.

Исследование пролиферативной активности моноцитов, производимое с помощью AlamarBlue-теста, у пациентов с ранними формами

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ХЦВН) ПРИ НАРУШЕНИЯХ ЛИПИДНОГО СПЕКТРА ($M \pm m$)

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY WITH LIPID SPECTRUM DISORDERS ($M \pm m$)

Показатели Indicators	Ветераны с ХЦВН с гиперлипидемией Veterans with chronic cerebrovascular insufficiency with hyperlipidemia n = 77	Ветераны с ХЦВН с нормолипидемией Veterans with chronic cerebrovascular insufficiency with normolipidemia n = 10	p difference confidence indicator
Моноциты, % Monocytes, %	10,8 $\pm$ 2,1	8,56 $\pm$ 1,40	
Моноциты, 10 ⁹ /л Monocytes, 10 ⁹ /l	0,94 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,04	< 0,01
% адгезии на пластик (визуальная оценка) % plastic adhesion (visual assessment)	67,30 $\pm$ 2,79	64,4 $\pm$ 3,5	
Адгезивная активность (RFU) Adhesive activity (RFU)	0,381 $\pm$ 0,040	0,145 $\pm$ 0,040	< 0,01
Пролиферативная активность моноцитов, AlamarBlue-тест (RFU) Monocyte proliferative activity, AlamarBlue test (RFU)	12560 $\pm$ 479	11345 $\pm$ 562	0,01
Спонтанная МТТ-активность, у. е. Spontaneous MTT activity, c. u.	0,12 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,02	
Индукцированная МТТ-активность, у. е. Induced MTT activity, c. u.	0,356 $\pm$ 0,060	0,312 $\pm$ 0,080	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ДЕРИВАТОВ ОКСИДА АЗОТА В КРОВИ И КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ХЦВН) В УСЛОВИЯХ НОРМО- И ГИПЕРЛИПИДЕМИИ ($M \pm m$)

TABLE 3. CONTENT OF NITRIC OXIDE DERIVATIVES IN THE BLOOD AND CULTURE FLUID IN PATIENTS WITH EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY UNDER CONDITIONS OF NORMAL AND HYPERLIPIDEMIA ($M \pm m$)

Показатели Indicators		Группа 1 Контрольная с нормолипидемией Group 1 Control with normolipidemia n = 30	Группа 2 Вeterаны с ранними формами ХЦВН с гиперлипидемией Group 2 Veterans with early forms of chronic cerebrovascular insufficiency with hyperlipidemia n = 87	p difference confidence indicator
NO ₂ , мкмоль/л Nitrates, μmol/l		2,9±0,2	3,30±0,18	
NO _x , мкмоль/л Total nitrate index, μmol/l		22,30±0,79	23,80±0,96	
NO ₃ , мкмоль/л Nitrates, μmol/l		19,3±0,7	20,6±0,9	
Спонтанная продукция, мкмоль/л Spontaneous production, μmol/l	NO ₂	9,50±0,44	13,10±0,52	< 0,01
	NO _x	38,6±0,8	41,0±0,7	< 0,01
	NO ₃	29,1±3,9	31,20±3,03	
Индукцированная продукция, мкмоль/л Induced products, μmol/l	NO ₂	10,10±0,45	9,80±0,61	
	NO _x	46,2±1,8	33,40±2,41	
	NO ₃	22,4±2,7	23,5±2,4	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

мами ХЦВН в условиях повышения отдельных липидных фракций обнаружило значимый рост показателя, доказывая непосредственное участие моноцитов крови в реакциях атероматоза, что в итоге приводит к клинической манифестации и прогрессивному течению системной, в том числе церебральной, сосудистой патологии.

Роль оксидативного стресса и окислительной модификации липопротеинов общеизвестна в патогенезе атеросклероза, в связи с этим нами исследована роль моноцитов в инициации оксидативного клеточного стресса с помощью определения МТТ-активности клеток. Моноциты пациентов с ранними формами ХЦВН имеют значительную тенденцию роста показателя активности, как в спонтанной, так и индуцированной пробе, отражающую интенсификацию процессов бактерицидности, обусловленную продукцией АФК, что в условиях гиперлипидемии провоцирует развитие оксидативного клеточного стресса.

Сосудистый эндотелий является активно метаболизующей тканью, синтезируя продукты, диаметрально противоположные по своим функциональным характеристикам, к которым можно отнести ряд вазоактивных пептидов, медиаторы воспаления, ростковые факторы, про- и дезагреганты. Снижение продукции вазодилаторов, в частности оксида азота, в условиях нарушений липидного обмена может привести к усилению констрикторных влияний на сосудистую стенку и развитию локального воспаления в ней. Проведенная нами оценка количества констрикторов и дилаторов преимущественно эндотелиального происхождения (derivатов оксида азота и одной из изоформ эндотелина-1) (табл. 3) у пациентов с ранними формами ХЦВН в условиях гиперлипидемии продемонстрировала отсутствие значимых изменений в содержании терминальных метаболитов оксида азота у лиц с нормо- и гиперлипидемией.

Интактные клетки эндотелиальной выстилки сосудов находятся в состоянии базального уровня функционирования, при котором конститутивная eNOS находится в состоянии редокс, то есть неактивна. В условиях повышенной потребности или ее несостоятельности функцию эндогенного поставщика оксида азота берет на себя индуцибельная синтаза моноцитарного или эндотелиального происхождения mas NOS, которая, помимо своей бактерицидной функции, обладает свойствами эндогенного вазодилатора.

При исследовании культуральной жидкости, взятой от неактивированных моноцитов пациентов с ранними формами ХЦВН, имеющих нарушения липидного спектра, в условиях *in vitro* имело место значимое повышение суммарной продукции стабильных метаболитов оксида азота и нитритов в сравнении с контрольной группой. Количество нитратов имело стойкую тенденцию к повышению. При этом в культуральной жидкости, взятой от моноцитов здоровых лиц, суммарная продукция молекул оксида азота выросла в среднем в 1,3 раза при стимуляции ЛПС *S. typhi* в дозе 25 мкг/мл, а моноциты пациентов с ранними формами ХЦВН не отвечали подъемом показателя, что свидетельствует об истощении функциональных резервов клеток в результате возможной гиперактивации. Многоликая роль интермедиатов оксида азота связана с его реакционной способностью. Что позволило выделить группу «реакционно-активных форм азота», по аналогии с кислородом, к которым относится, в том числе, и монооксид азота, пероксинитрит и нитрит (диоксид азота). В свою очередь, пероксинитрит способен значительно модифицировать мембраносвязанные молекулы практически любых биологических мембран, инактивировать ферменты антиоксидантной защиты. Тем не менее двойственность механизмов действия на различные структуры клетки, с одной стороны, как стимуляторов метаболических процессов, с другой — как повреждающих факторов, зависит от концентрации и величины сигнала. В низких концентрациях активные формы азота работают как стимуляторы биологической активности клетки, ее адаптационного потенциала, за счет, например, включения генов фактора ядерной транскрипции (NF-κB). В условиях гиперлипидемии высоконасыщенные липидами мембраны клеток становятся доступной мишенью для мощных прооксидантов из числа реакционно-активных молекул азота, инициируя явление нитрозативного клеточного стресса.

Известно, что нитрозилированию, то есть введению нитрогруппы в молекулы органических соединений в условиях окислительного клеточного стресса, могут подвергаться не только ли-

пиды, но и белковые соединения, например аминокислота тирозин, с образованием конечного стабильного продукта окисления нитротирозина, при этом последний может претендовать на роль биомаркера выраженности окислительного нитрозативного стресса, наличия системного воспалительного ответа и принимать косвенное участие в формировании некоторых нейродегенеративных процессов ЦНС. Имеются отдельные сведения о роли нитротирозина в качестве триггера ремоделирования сосудистой стенки.

Исследование концентрации нитротирозина у пациентов с ранними формами ХЦВН показало его достоверное повышение при I, II и IV типах гиперлипидемий, характеризующихся высоким содержанием атерогенных фракций липидов, соответственно, $3,6 \pm 0,02$ нМ ($p = 0,02$); $4,2 \pm 0,02$ нМ ($p = 0,001$); $3,8 \pm 0,02$ нМ ($p = 0,03$) в сравнении с показателем контрольной группы с нормолипидемией ($0,97 \pm 0,003$) нМ. Так как формирование ранних форм хронической цереброваскулярной недостаточности происходит на фоне системного поражения сосудистого русла, можно считать повышение показателей нитротирозина маркером нитрозативного повреждения эндотелия токсичными соединениями оксида азота и фактором медиаторного повреждения стенки сосудов, усугубляющего дисфункцию эндотелия.

Концепция формирования эндотелиальной дисфункции постулирует наличие дисбаланса вазоактивных факторов, поэтому нами предпринято определение одного из наиболее мощных вазоконстрикторов — эндотелина-1 (ЭТ-1), который является секреторным продуктом эндотелиальных, гладкомышечных клеток, а также нейронов, астроцитов и некоторых других эпителиоцитов. В условиях спазма и ишемии сосудов синтез эндотелина-1 стимулируется тромбином, адреналином, провоспалительными цитокинами (IL-1, IL-6). Высокие концентрации эндотелина-1 могут полностью нивелировать действие вазодилаторов, в том числе оксида азота. Кроме эндотелина, в процессах ремоделирования сосудистой стенки активное участие принимает важнейший фактор ангиогенеза — сосудистый фактор роста эндотелия (VEGF), обладающий способностью к индукции хемотаксического передвижения моноцитов и клеток эндотелия, и играет важнейшую роль в процессах неоангиогенеза.

Кроме дисфункциональных изменений сосудов, представляет особый интерес морфологическая диагностическая оценка эндотелиопатии как наиболее объективный критерий повреждения сосудистой стенки. Нами произведена цитологическая оценка эндотелиальной дисфункции, основанная на подсчете циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов, клеток эндотелия,

которые слущиваются с поверхности сосудистой стенки в результате ее повреждения. В нормальных условиях количество данных клеток очень мало, и, попадая в кровоток, они поглощаются клетками моноцитарно-макрофагальной системы. Следовательно, их повышение в системном кровотоке является отражением массивного повреждения эндотелия (табл. 4).

Анализ данных таблицы 4 показал почти двукратное повышение уровня эндотелина-1 в сыворотке пациентов с ранними формами ХЦВН при гиперлипидемии в сравнении с группой контроля. Из этого следует, что повышение отдельных фракций липопротеидов в крови или их комбинации, окислительная модификация могут способствовать индукции синтеза ЭТ-1, который, в свою очередь, обладая рядом эффектов на сосудистую стенку, приводит к ее ремоделированию за счет митогенеза, стимуляции гладкомышечных клеток, фибробластов и тем самым к участию в процессах неоангиогенеза [2]. Подтверждением тому служит избыточная концентрация васкуло-эндотелиального фактора роста в этих условиях, приводящая к изменению контрактильности сосудистой стенки, повышению проницаемости гемато-энцефалического барьера [5]. Расчет соотношения вазоактивных факторов показал самый высокий коэффициент в группе здоровых мужчин с нормальными параметрами липидного спектра крови, преимущественно за счет низко-

го уровня продукции ЭТ-1. В группе пациентов с ранними формами ХЦВН расчетный показатель оказался ниже практически в 2 раза, за счет снижения содержания нитритов в сыворотке и высокого значения показателя ЭТ-1. Кроме того, доказано, что повышенная секреция ЭТ-1 способствует синтезу простагландинов и тромбоксанов, обладающих констрикторным и проагрегантным действием.

Известно также свойство VEGF отвечать релаксирующей реакцией, взаимодействуя через PI3K/Akt- и MAPK-пути, а также посредством активации синтеза простациклина (PGI₂), одного из мощнейших вазодилататоров, следовательно, повышение васкулоэндотелиального фактора роста в данных условиях можно рассматривать как некий механизм компенсации NO-зависимой вазодилатации.

Количество ЦДЭ в контрольной группе, согласно нашим данным, не превышало нормы, данной в работе [11] (2-4 клетки/100 мкл). При ранних формах ХЦВН в условиях гиперлипидемии происходило значительное (в 2,8 раза) повышение концентрации десквамированных эндотелиоцитов в кровотоке, что является прямым следствием повреждения эндотелия и наличия системной эндотелиопатии.

Вазопрессорный профиль сыворотки крови неизбежно сказывается на изменении гемореологии и сопровождается нарушением адгезивных

ТАБЛИЦА 4. ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО И МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ХЦВН) В УСЛОВИЯХ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ (M±m)

TABLE 4. INDICATORS OF THE FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL STATE OF THE ENDOTHELIUM IN EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY IN CONDITIONS OF HYPERLIPIDEMIA (M±m)

Показатели Indicators	Группа 1 Контрольная с нормолипидемией Group 1 Control with normolipidemia n = 30	Группа 2 Ветераны с ранними формами ХЦВН с гиперлипидемией Group 2 Veterans with early forms of chronic cerebrovascular insufficiency with hyperlipidemia n = 77	p difference confidence indicator
Эндотелин-1, фмоль/мл Endothelin 1, fmol/ml	1,7±0,1	4,9±0,1	0,002
NO ₂ /ЭТ-1 Nitrites/endothelin-1	3,60±0,15	1,31±0,50	< 0,01
VEGF, пг/мл VEGF, pg/ml	30,6±5,6	83,8±2,4	0,001
ЦДЭ, клеток/100 мкл CEA, cells/100 µl	2,4±0,4	6,9±0,5	0,001

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 5. ФАКТОРЫ ТРОМБОГЕННОГО РИСКА У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ХЦВН) В УСЛОВИЯХ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ (M±m)

TABLE 5. THROMBOGENIC RISK FACTORS IN PATIENTS WITH EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR INSUFFICIENCY IN CONDITIONS OF HYPERLIPIDEMIA (M±m)

Показатели Indicators	Группа 1 Контрольная с нормолипидемией Group 1 Control with normolipidemia n = 30	Группа 2 Ветераны с ранними формами ХЦВН с гиперлипидемией Group 2 Veterans with early forms of chronic cerebrovascular insufficiency with hyperlipidemia n = 77	p difference confidence indicator
Фибриноген, г/л Fibrinogen, g/l	2,70±0,19	6,71±0,10	0,02
Антитромбин-III, % Antithrombin III, %	103,1±3,4	102,7±2,3	
Эуглобулиновый фибринолиз, мин Euglobulin fibrinolysis, min	226,70±11,08	289,8±4,9	< 0,01

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

и агрегационных свойств тромбоцитов, что играет значимую роль в прогрессировании ранних форм хронической цереброваскулярной недостаточности. В связи с этим нами проведено исследование факторов тромботического риска (уровня фибриногена, антитромбина-III, времени эуглобулинового фибринолиза (табл. 5)).

Согласно исследованиям, на фоне проатерогенных изменений липидного спектра сыворотки крови у пациентов с ранними формами ХЦВН отмечены более высокие параметры эуглобулинового фибринолиза, отражающие удлинение времени растворения сгустка, что характеризует повышение тромботического риска и повышение концентрации фибриногена, что отражается на изменении гемореологии крови в условиях формирования ранних нарушений церебральной гемодинамики.

Таким образом, формирование ранних форм хронической цереброваскулярной недостаточности важнейшее значение имеет прогрессирование системной сосудистой патологии, обусловленное рядом неблагоприятных факторов: количественным и качественным нарушением липидного гомеостаза, эндотелиопатией, дисбалансом вазоактивных молекул и изменением гемореологии. Выявленные нами четыре вида гиперлипидемий более чем у 90% ветеранов с ранними формами ХЦВН, среди которых наиболее атерогенным является ПБ тип, могут быть одним из важнейших триггерных факторов развития системного и церебрального атеросклероза, что на фоне ремоделирующих сосудистых перестроек и нарушения проницаемости ГЭБ лежит в основе патогенеза прогрессирования хронической цереброваскулярной патологии.

Список литературы / References

1. Альтман Д.Ш., Давыдова Е.В. К вопросу о роли аутоиммунных механизмов в прогрессии ранних форм хронической ишемии мозга // Российский иммунологический журнал, 2013. Т. 7 (16), № 2-3 (1). С. 18-20. [Altman D.Sh., Davydova E.V. On the role of autoimmune mechanisms in the progression of early forms of chronic brain ischemia. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (16), no. 2-3 (1), pp. 18-20. (In Russ.)]
2. Гринштейн А.Б., Шнайдер Н.А. Цереброваскулярные осложнения артериальной гипертензии. Красноярск: КГМА, 2002. 160 с. [Greenstein A.B., Schneider N.A. Cerebrovascular complications of arterial hypertension]. Krasnoyarsk: Krasnoyarsk State Medical Academy, 2002. 160 p.
3. Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Российские рекомендации (четвертый пересмотр) // Системные гипертензии, 2010. № 3. С. 5-26. [Diagnosis and treatment of hypertension. Russian recommendations (fourth revision). *Sistemnyye gipertenzii = Systemic Hypertension*, 2010, no. 3, pp. 5-26. (In Russ.)]

4. Емченко Н.Л., Цыганенко О.И., Ковалевская Т.В. Универсальный метод определения нитратов в биосредах организма // Клиническая лабораторная диагностика, 1994. № 6. С. 19-20. [Yemchenko N.L., Tsyganenko O.I., Kovalevskaya T.V. Universal method for the determination of nitrates in the biological media of the body. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 1994, no. 6, pp. 19-20. (In Russ.)]
5. Коваль С.Н., Милославский Д.К., Снегурская И.А. Терапевтический ангиогенез при заболеваниях внутренних органов – возможности и перспективы // Вісник проблем біології і медицини, 2013. Т. 1 (104), вип. 4. С. 20-27. [Koval S.N., Miloslavsky D.K., Snegurskaya I.A. Therapeutic angiogenesis in diseases of internal organs – opportunities and prospects. *Visnik problem biologii i meditsini = Bulletin of Biological Problems and Medicine*, 2013, Vol. 1 (104), Iss. 4, pp. 20-27. (In Russ.)]
6. Коробейникова Э.Н. Показатели липидного обмена в сыворотке практически здорового населения, проживающего в Южно-Уральском регионе в условиях адаптации к климатическим и техногенным воздействиям: методические рекомендации. Челябинск, 2002. С. 40-43. [Korobeynikova E.N. Indicators of lipid metabolism in the serum of a practically healthy population living in the South Ural region in terms of adaptation to climatic and man-made influences: guidelines]. Chelyabinsk, 2002, pp. 40-43.
7. Шмидт Е.В. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга // Журнал невропатологии и психиатрии, 1985. № 9. С. 1281-1288. [Schmidt E.V. Classification of vascular lesions of the brain and spinal cord. *Zhurnal nevropatologii i psikhiatrii = Journal of Neuropathology and Psychiatry*, 1985, no. 9, pp. 1281-1288. (In Russ.)]
8. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2005, Vol. 11, pp. 127-152.
9. Felten D., Maida M.E. Psychoneuroimmunology // in book: Encyclopedia of the human brain. Ed.-in-chief V.S. Ramachandran. Academic Press, 2002, Vol. 4, pp. 103-127.
10. Gorelick P.B. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of stroke. *Am. J. Cardiol.*, 2008, Vol. 101, no. 12A, pp. 34F-40F.
11. Hladovec J., Prerovsky I., Stanek V. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klin. Wochenschr.*, 1978, Vol. 56, pp. 1033-1036.

Авторы:

Давыдова Е.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

Зурочка А.В. — д.м.н., профессор, профессор кафедры пищевых и биотехнологий, заведующий лабораторией молекулярной генетики и биотехнологии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск; ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Davydova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Food Technology and Biotechnology, Head, Laboratory of Molecular Genetics and Biotechnology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk; Leading Research Associate, Laboratory of Immunology Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Зурочка В.А. — д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск; старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Альтман Д.Ш. — д.м.н., профессор кафедры нервных болезней ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

Zurochka V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Food Technology and Biotechnology, Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Genetics and Biotechnology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk; Senior Research Associate, Laboratory of Immunology Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Altman D.Sh., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Nervous Diseases, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 25.03.2019
Отправлена на доработку 05.04.2019
Принята к печати 09.04.2019

Received 25.03.2019
Revision received 05.04.2019
Accepted 09.04.2019

ГОРМОНАЛЬНЫЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АУТОИММУННОГО ТИРЕОИДИТА У ЛИЦ В СЕМЬЯХ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Болотская Л.А., Тарлюн А.А.

*БУ ВО Ханты-Мансийского автономного округа — Югры «Сургутский государственный университет»,
г. Сургут, Россия*

Резюме. Изучены гормональные и иммунологические характеристики дебюта аутоиммунного тиреоидита у лиц, имеющих в семьях первой и второй степени родства родственников с аутоиммунными заболеваниями. Возраст исследуемой группы пациентов составил 31 ± 14 лет, 60 женщин и 7 мужчин. Все пациенты были обследованы клинико-лабораторными и инструментальными методами в соответствии со стандартами обследования для аутоиммунного тиреоидита и сахарного диабета 1 типа. Дополнительно определяли сывороточные иммуноглобулины классов А, М, G и аутоантитела к инсулину, клеткам поджелудочной железы. У больных аутоиммунным тиреоидитом, вне зависимости от наличия/отсутствия семейного анамнеза по аутоиммунным заболеваниям, было выявлено повышение ($p < 0,01$) содержания общего холестерина (на 63,6-65,9%), базальной гликемии (на 20-25%), тиреотропного гормона (на 79-104%) на фоне снижения ($p < 0,01$) тиреоглобулина (на 8-17,8%) в сравнении с контрольной группой. У больных аутоиммунным тиреоидитом и сахарным диабетом 1 типа при наличии аутоиммунных заболеваний в семье отмечалось достоверное увеличение постпрандиальной глюкозы, гликированного гемоглобина ($p < 0,01$) в сравнении с контролем. У всех пациентов исследуемой группы наблюдалось достоверное ($p < 0,001$) повышение аутоантител к тиреопероксидазе в сравнении с контролем и внутри подгруппы с наличием сахарного диабета 1 типа с аутоиммунными заболеваниями в семье ($p < 0,005$). При этом у больных аутоиммунным тиреоидитом и сахарным диабетом 1 типа с отягощенным семейным анамнезом по аутоиммунным заболеваниям регистрируется достоверное повышение аутоантител к инсулину, собственным компонентам поджелудочной железы ($p < 0,005$) в сравнении с подгруппой больных без сахарного диабета 1 типа и с подгруппой без отягощенного семейного анамнеза. Гипериммуноглобулинемия по А, G ($p < 0,05-0,001$) прослеживается вне зависимости от наличия сахарного диабета 1 типа и от наследственности по аутоиммунным заболеваниям. У лиц с аутоиммунным тиреоидитом на фоне сахарного диабета 1 типа в семьях с аутоиммунными заболеваниями повышение показателей гуморального иммунитета достоверно в сравнении с пациентами без сахарного диабета 1 типа ($p < 0,005$) и без отягощенного семейного анамнеза ($p < 0,01$). Таким образом, у лиц с аутоиммунным тиреоидитом на фоне сахарного диабета 1 типа в гипотиреозе, имеющих в семьях первой и второй степени родства родственников с аутоиммунными заболеваниями, регистрируются более выраженные изменения содержания гормонов щитовидной железы, содержания аутоантител к ряду поверхностных и внутренних структур клеток органов эндокринной системы, сывороточных иммуноглобулинов в сравнении с пациентами

Адрес для переписки:

*Болотская Лариса Алексеевна
БУ ВО Ханты-Мансийского автономного округа — Югры
«Сургутский государственный университет»
628408, Россия, г. Сургут, ул. Энергетиков, 22.
Тел.: 8 (3462) 76-30-59.
E-mail: labolotskaya@mail.ru*

Address for correspondence:

*Bolotskaya Larisa A..
Surgut State University
628408, Russian Federation, Khanty-Mansiysk Autonomous
District, Surgut, Energetikov str. 22.
Phone: 7 (3462) 76-30-59.
E-mail: labolotskaya@mail.ru*

Образец цитирования:

*Л.А. Болотская, А.А. Тарлюн «Гормональные и иммунологические особенности аутоиммунного тиреоидита у лиц в семьях с аутоиммунными заболеваниями» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1055-1062.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1055-1062
© Болотская Л.А., Тарлюн А.А., 2019*

For citation:

*L.A. Bolotskaya, A.A. Tarlyun "Hormonal and immunological features of autoimmune thyroiditis in persons in families with autoimmune diseases", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1055-1062. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1055-1062
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1055-1062*

без отягощенного семейного анамнеза. Поэтому диагностирование хотя бы одного аутоиммунного заболевания у члена семьи повышает настороженность пациентов и врачей и способствует раннему выявлению аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: гуморальный иммунитет, семейные случаи аутоиммунных заболеваний, сахарный диабет 1 типа, аутоиммунный тиреоидит, родители, потомки

HORMONAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF AUTOIMMUNE THYROIDITIS IN PERSONS IN FAMILIES WITH AUTOIMMUNE DISEASES

Bolotskaya L.A., Tarlyun A.A.

Surgut State University, Surgut, Khanty-Mansiysk Autonomous District, Russian Federation

Abstract. Hormonal and immunological characteristics of have been studied in individuals with initial autoimmune thyroiditis who have first- and second-degree relatives with autoimmune diseases. The age of the studied group of patients was 31 ± 14 years, 60 women and 7 men. All the patients were examined by clinical, laboratory and instrumental methods in accordance with examination standards for autoimmune thyroiditis and type 1 diabetes mellitus. In addition, A, M, and G serum immunoglobulins and autoantibodies to insulin, pancreatic cells were determined. In patients with autoimmune thyroiditis, regardless of the presence / absence of a family history of autoimmune diseases, we have found an increase ($p < 0.01$) in total cholesterol content (by 63.6-65.9%), basal hyperglycemia (by 20-25%), higher thyroid-stimulating hormone (by 79-104%) in presence with decreased thyroglobulin levels (by 8-17.8%; $p < 0.01$), in comparison with the control group. There was a significant increase in postprandial glucose and glycated hemoglobin ($p < 0.01$) in patients with autoimmune thyroiditis and type 1 diabetes, in cases of familial autoimmune diseases, as compared to the controls. In all patients of the study group, there was a significant ($p < 0.001$) increase in autoantibodies to thyroperoxidase, compared with controls, and within the subgroup with co-existence of type 1 diabetes and autoimmune diseases in the family ($p < 0.005$).

At the same time, the patients with autoimmune thyroiditis and type 1 diabetes mellitus with aggravated family history for autoimmune diseases have shown a significant increase of insulin autoantibodies, and to own pancreatic components ($p < 0.005$) when comparing with subgroup of patients without type 1 diabetes and, compared with a subgroup of patients without family history of type 1 diabetes mellitus and other autoimmune disorders.

Increased IgA and IgG in blood serum ($p < 0.05-0.001$) can be traced, regardless of the presence of type 1 diabetes and familial autoimmune anamnesis. Increase of humoral immunity indices was significant in the persons with autoimmune thyroiditis accomplished by the type 1 diabetes in families with autoimmune diseases, in comparison with patients without type 1 diabetes ($p < 0.005$) and without burdened family history ($p < 0.01$). Hence, we have registered more pronounced changes in thyroid hormones, the contents of autoantibodies to a number of surface and internal structures of endocrine organs, as well as serum immunoglobulins in the persons with autoimmune thyroiditis accomplished by type 1 diabetes in hypothyreosis with first- and second-degree relatives with autoimmune diseases, in comparison with patients without burdened family history. Therefore, the diagnosis of at least one autoimmune disorder in a family member increases the alertness of patients and doctors, thus contributing to the early detection of autoimmune diseases.

Keywords: humoral immunity, autoimmune disorders, familial cases, type I diabetes mellitus, autoimmune thyroiditis, parents, descendants

Введение

В инициации любого аутоиммунного заболевания лежит взаимодействие трех групп факторов: базисных (генетические, пол, гормональные особенности, изменения тимуса), инициирующих (роль суперантигенов на клетки адаптивного

иммунитета) и производящих (нарушение функции иммунной системы с развитием аутоагрессии на фоне снижения супрессорных механизмов) [3, 5].

В развитии хронических аутоиммунных заболеваний — аутоиммунного тиреоидита (АИТ)

и сахарного диабета 1 типа (СД 1 типа) — лежат сходные патогенетические и иммунные нарушения по клеточному и гуморальному типам, что приводит к деструкции органоспецифических клеток [2, 4, 6, 8].

Наличие отягощенного семейного анамнеза по аутоиммунным заболеваниям щитовидной железы (ЩЖ) встречается у половины пациентов с АИТ. Выявление кластеров семейного наследования аутоиммунных заболеваний позволяет риск возникновения аутоиммунных заболеваний ЩЖ у лиц с отягощенным семейным анамнезом [9, 10].

Доказательство существования генетического ожидания, кластеризация АИТ в семьях, результаты близнецовых исследований вместе с изучением генов-кандидатов, ассоциированных с риском данного заболевания, не только приближают нас к более полному пониманию патофизиологии данного состояния, но и дают возможность сформулировать некоторые принципы, позволяющие более эффективно наблюдать данную группу пациентов [7, 11, 12].

Цель исследования — изучить гормональные и иммунологические характеристики АИТ и АИТ на фоне СД 1 типа с исходом в гипотиреоз у лиц, имеющих в семьях первой и второй степени родства (родитель — потомок, сибсы) родственников с аутоиммунными заболеваниями.

Материалы и методы

Все пациенты, участвующие в исследовании, давали информированное согласие. Общим критерием включения пациентов в исследование было наличие впервые выявленного АИТ, пациенты имели в семьях первой и второй степени родства (родитель — потомок, сибсы) родственников с аутоиммунными заболеваниями.

Критериями исключения являлись: послеоперационный гипотиреоз, развившийся из-за оперативного лечения узлового зоба, рака ЩЖ, гипертиреоз, диагностированный узловой зоб, подострый, послеродовой тиреоидит, субклинический гипотиреоз или тиреотоксикоз неустановленной этиологии, нарушенная функция ЩЖ вследствие приема лекарственных препаратов (амиодарон, йодсодержащие рентгенконтрастные соединения, интерфероны, литийсодержащие препараты).

Было обследовано 67 пациентов: 60 женщин и 7 мужчин, средний возраст 31 ± 14 лет, в дебюте АИТ, которые составили две исследуемые группы: 55 пациентов с АИТ и 25 человек, имеющих сочетанную патологию: АИТ и СД 1 типа. Все пациенты находились в состоянии гипотиреоза. Контрольная группа состояла из 30 условно здо-

ровых человек (доноры крови), сопоставимых по возрасту.

В подгруппе больных АИТ 10 пациентов имели в семьях родственников первой линии с аутоиммунными заболеваниями: крови (аутоиммунная тромбоцитопения) — 1 человек (1,8%), соединительной ткани (ревматоидный артрит) — 1 человек (1,8%), эндокринной системы (болезнь Аддисона) — 8 человек (14,6%). Среди больных АИТ с СД 1 типа четверо имели родственников первой линии с аутоиммунными заболеваниями: нервной системы (рассеянный склероз) — 1 человек (8,3%), соединительной ткани (ревматоидный артрит) — 3 человека (25%).

Диагноз «АИТ» устанавливался на основании больших диагностических признаков: первичный гипотиреоз (манифестный или стойкий субклинический); наличие антител (АТ) к ткани ЩЖ и ультразвуковые признаки аутоиммунной патологии [1].

Пациенты с АИТ на фоне СД 1 типа получали базовую терапию инсулином пролонгированного действия «Гларгин» («Санофи-Авентис-Восток ЗАО», Россия) в среднесуточной дозе $25 + 7,8$ ед., инсулин короткого действия «Аспарт» («Ново Нордиск», Дания/Россия) в среднесуточной дозе $20 + 5,6$ ед. При включении в исследование все пациенты с гипотиреозом получали препарат L-тироксин («Озон», Россия), суточная доза которого составила $1,4 - 1,7$ мкг/кг массы тела.

Кровь для биохимических, иммунологических исследований забиралась утром натощак. При проведении оценки функционального состояния системы гипотиз — щитовидная железа изучали гормоны сТ3, сТ4, ТТГ, ТГ методом иммуноферментного анализа на стандартных плашках по методике «БиоХимМак» на анализаторе Sample Report Access 2 Immunoassay System S/N 506414 (Beckman Coulter, США). Биохимическое исследование крови по показателям липидного, углеводного обменов проводилось иммунохимическим методом на анализаторе Olympus AU640 (США). Специфический гуморальный иммунитет исследовали определением сывороточных IgA, IgM, IgG и аутоантител (АутоАТ) к тиреоглобулину (ТГ), тиреопероксидазе (ТПО), инсулину, клеткам поджелудочной железы. Содержание глюкозы в плазме оценивали глюкозооксидазным методом с помощью анализатора BIOSEN C-line Clinic (EKF Diagnostic, Германия). Ферментативный колориметрический метод использовался для определения сывороточного содержания общего холестерина, триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) (наборы «Диакон», Россия).

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программного

продукта SPSS v. 11.5 методами непараметрического анализа. Количественные показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха — Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Статистическую значимость различий между двумя независимыми количественными переменными оценивали с использованием U-критерия Манна–Уитни. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы p принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Среди пациентов в дебюте АИТ с исходом в гипотиреоз наблюдалось 55 человек (82%), среди которых 10 пациентов имели в семьях родственников первой линии с аутоиммунными заболеваниями: крови (аутоиммунная тромбоцитопения) — 1 человек (1,8%), соединительной ткани (ревматоидный артрит) — 1 человек (1,8%), эндокринной системы (болезнь Аддисона) — 8 человек (14,6%). В группе больных АИТ в сочетании с СД 1 типа в гипотиреоидном состоянии находились 12 человек (18%), четверо из которых имели родственников первой линии с аутоиммунными заболеваниями: нервной системы (рассеянный склероз) — 1 человек (8,3%), соединительной ткани (ревматоидный артрит) — 3 человека (25%).

При исследовании показателей липидного, углеводного и гормонального профиля ЩЖ у пациентов исследуемой группы, вне зависимости от наличия/отсутствия семейного анамнеза по аутоиммунным заболеваниям, обнаружено достоверное повышение ($p < 0,01$) содержания общего холестерина на 63,6–65,9%, базальной гликемии на 20–25% в сравнении с контрольной группой. У больных АИТ с СД 1 типа при наличии аутоиммунных заболеваний в семье отмечалось достоверное увеличение постпрандиальной глюкозы, гликированного гемоглобина ($p < 0,01$) в сравнении с контролем (табл. 1).

Достоверно повышенное содержание ТТГ в сравнении с контрольной группой на 79–104% на фоне снижения ТГ на 8–17,8% ($p < 0,01$) наблюдалось у пациентов исследуемой группы вне наличия/отсутствия СД 1 типа и семейного анамнеза по аутоиммунным заболеваниям. Однако только у больных АИТ с наличием СД 1 типа и отягощенным семейным анамнезом по аутоиммунным заболеваниям повышение ТТГ и снижение ТГ было достоверным внутри подгруппы ($p < 0,01$ – $0,005$) (табл. 2).

У всех пациентов исследуемой группы наблюдалось достоверное ($p < 0,001$) повышение АутоАТ к ТПО в сравнении с контролем и внутри подгруппы с наличием СД 1 типа с аутоиммунными заболеваниями в семье ($p < 0,005$). В подгруппе

больных с АИТ и СД 1 типа с отягощенным семейным анамнезом по аутоиммунным заболеваниям регистрируется достоверное повышение АутоАТ к инсулину, собственным компонентам поджелудочной железы ($p < 0,005$) в сравнении с подгруппой больных АИТ без СД 1 типа и в сравнении с подгруппой без отягощенного семейного анамнеза.

Гипериммуноглобулинемия по А, G ($p < 0,05$ – $0,001$) прослеживается вне зависимости от наличия СД 1 типа и от наследственности по аутоиммунным заболеваниям. У лиц с АИТ на фоне СД 1 типа в семьях с аутоиммунными заболеваниями повышение показателей гуморального иммунитета достоверно в сравнении с пациентами без СД 1 типа ($p < 0,005$) и без отягощенного семейного анамнеза ($p < 0,01$) (табл. 3).

Заключение

Таким образом, у пациентов с АИТ на фоне СД 1 типа с исходом в гипотиреоз у лиц первой степени родства (родитель — потомок, сибсы) в семьях с аутоиммунными заболеваниями регистрируются изменения содержания гормонов ЩЖ, содержания аутоАТ к ряду поверхностных и внутренних структур клеток органов эндокринной системы, сывороточных иммуноглобулинов. Данные изменения являются наиболее выраженными в сравнении с пациентами без отягощенного семейного анамнеза.

Поскольку при хроническом АИТ с исходом в гипотиреоз характерно длительное, малосимптомное течение, диагностирование хотя бы одного аутоиммунного заболевания у члена семьи повышает настороженность пациентов и врачей и способствует раннему выявлению аутоиммунных заболеваний.

Таким образом, у лиц с АИТ на фоне СД 1 типа в гипотиреозе, имеющих в семьях первой и второй степени родства родственников с аутоиммунными заболеваниями регистрируются более выраженные изменения содержания гормонов ЩЖ, содержания аутоАТ к ряду поверхностных и внутренних структур клеток органов эндокринной системы, сывороточных иммуноглобулинов в сравнении с пациентами без отягощенного семейного анамнеза.

Поэтому диагностирование хотя бы одного аутоиммунного заболевания у члена семьи повышает настороженность пациентов и врачей и способствует раннему выявлению аутоиммунных заболеваний.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО, УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В КРОВИ БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ В ГИПОТИРЕОИДНОМ СОСТОЯНИИ ПРИ ПЕРВИЧНОМ ИССЛЕДОВАНИИ В СРАВНЕНИИ С КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППОЙ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. INDICATORS OF LIPID, CARBOHYDRATE EXCHANGE IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS IN HYPOTHYROID CONDITION DURING PRIMARY RESEARCH IN COMPARISON WITH THE CONTROL GROUP, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Indicator	Контрольная группа Control group (n = 30)	Исследуемая группа пациентов Study group of patients (n = 67)			
		Больные АИТ AIT patients (n = 55)		Больные АИТ с СД 1 типа AIT patients with type 1 diabetes (n = 12)	
		С аутоиммунными заболеваниями в семье With autoimmune diseases in the family (n = 10)	Без аутоиммунных заболеваний в семье Without autoimmune diseases in the family (n = 45)	С аутоиммунными заболеваниями в семье With autoimmune diseases in the family (n = 4)	Без аутоиммунных заболеваний в семье Without autoimmune diseases in the family (n = 8)
Холестерин ЛПНП, мМ LDL-cholesterol, mM	2,6 (2,55-2,80)	2,8 (2,78-2,80)	2,7 (2,7-2,8)	2,8 (2,85-2,90)	2,7 (2,70-2,78)
Холестерин ЛПВП, мМ HDL-cholesterol, mM	1,2 (1,2-1,3)	1,32 (1,30-1,32)	1,29 (1,28-1,30)	1,3 (1,35-1,40)	1,25 (1,2-1,3)
Общий холестерин, мМ Total cholesterol, mM	4,4 (4,4-4,5)	7,3 (7,2-7,4) $p < 0,01$	7,2 (7,1-7,2) $p < 0,01$	7,3 (7,3-7,3) $p < 0,01$	7,2 (7,10-7,27) $p < 0,01$
Глюкоза базальная, мМ Glucose basal, mM	4,6 (4,6-4,7)	5,6 (5,6-5,7) $p < 0,01$	5,55 (5,50-5,58) $p < 0,01$	5,75 (5,6-5,9) $p < 0,01$	5,55 (5,5-5,6) $p < 0,01$
Глюкоза постпрандиальная, мМ Glucose postprandial, mM	7,8 (7,7-7,8)	8,0 (8,0-8,1)	7,9 (7,8-7,9)	8,5 (8,55-8,60) $p_1 < 0,01$	8,45 (8,4-8,5)
HbA1c, %	6,0 (6,0-6,1)	6,1 (6,1-6,1)	6,0 (6,00-6,05)	6,4 (6,4-6,4) $p_1 < 0,001$	6,25 (6,2-6,3)

Примечание. p – достоверность различий от контроля; p₁ – достоверность различий показателей между подгруппами: АИТ и АИТ с СД 1 типа; p₂ – достоверность различий показателей в подгруппах в зависимости от наличия/отсутствия семейной наследственности.

Note. p. significance of differences from control; p₁, reliability of differences in indicators between subgroups: AIT and AIT with type 1 diabetes; p₂, reliability of differences in indicators in subgroups depending on the presence/absence of family heredity.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ГОРМОНАЛЬНОГО ПРОФИЛЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КРОВИ БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ В ГИПОТИРЕОИДНОМ СОСТОЯНИИ ПРИ ПЕРВИЧНОМ ИССЛЕДОВАНИИ В СРАВНЕНИИ С КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППОЙ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)
TABLE 2. INDICATORS OF THE HORMONAL PROFILE OF THYROID IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH AUTOIMMUNE TYRIDE IN THE HYPOTHYROID CONDITION DURING PRIMARY INVESTIGATION IN COMPARISON WITH THE CONTROL GROUP, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Indicator	Контрольная группа Control group (n = 30)	Исследуемая группа пациентов Study group of patients (n = 67)			
		Больные АИТ AIT patients (n = 55)		Больные АИТ с СД 1 типа AIT patients with type 1 diabetes (n = 12)	
		С аутоиммунными заболеваниями в семье With autoimmune diseases in the family (n = 10)	Без аутоиммунных заболеваний в семье Without autoimmune diseases in the family (n = 45)	С аутоиммунными заболеваниями в семье With autoimmune diseases in the family (n = 4)	Без аутоиммунных заболеваний в семье Without autoimmune diseases in the family (n = 8)
св Т3, пмоль/л T3, pmol/l	2,1 (2,05-2,30)	2,3 (2,3-2,4)	2,65 (2,55-2,65)	2,3 (2,2-2,3)	2,4 (2,4-2,6)
св Т4, пмоль/л T4, pmol/l	1,1 (0,85-1,25)	0,7 (0,70-0,75)	1,05 (0,90-1,05)	0,65 (0,6-0,7)	0,75 (0,7-0,8)
ТТГ, МЕ/мл TSH, ME/ml	3,2 (3,15-3,25)	6,3 (6,2-6,3) p < 0,01	6,1 (6,0-6,2) p < 0,01	6,55 (6,50-6,75) p < 0,01 p ₂ < 0,01	5,75 (5,6-5,8) p < 0,01
ТГ, ммоль/л TG, mmol/l	1,4 (1,25-1,45)	1,2 (1,1-1,2) p < 0,01	1,3 (1,2-1,3) p < 0,01	1,15 (1,1-1,2) p < 0,01 p ₂ < 0,005	1,2 (1,10-1,28) p < 0,01

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. СОСТОЯНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ В ГИПОТИРЕОИДНОМ СОСТОЯНИИ ПРИ ПЕРВИЧНОМ ИССЛЕДОВАНИИ В СРАВНЕНИИ С КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППОЙ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. CONDITION OF THE HUMORAL IMMUNITY TREATMENT OF PATIENTS WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS IN A HYPOTHYROID CONDITION DURING PRIMARY RESEARCH IN COMPARISON WITH THE CONTROL GROUP, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Indicator	Контрольная группа Control group (n = 30)	Исследуемая группа пациентов Study group of patients (n = 67)			
		Больные АИТ AIT patients (n = 55)		Больные АИТ с СД 1 типа AIT patients with type 1 diabetes (n = 12)	
		С аутоиммунными заболеваниями в семье With autoimmune diseases in the family (n = 10)	Без аутоиммунных заболеваний в семье Without autoimmune diseases in the family (n = 45)	С аутоиммунными заболеваниями в семье With autoimmune diseases in the family (n = 4)	Без аутоиммунных заболеваний в семье Without autoimmune diseases in the family (n = 8)
АутоАТ к ТГ, МЕ/мл AutoAB to TG, ME/ml	0	1,8 (1,75-1,80)	1,55 (1,53-1,55)	1,8 (1,7-1,8)	1,4 (1,30-1,58)
АутоАТ к ТПО, МЕ/мл AutoAB to TPO, ME/ml	6,2 (4,2-6,7)	850 (800,0-875,5) p < 0,001	740 (735-750) p < 0,001	1160 (1112,5-1275,0) p < 0,001 p ₁ < 0,005 p ₂ < 0,01	790 (732,5-835,0) p < 0,001
АутоАТ к инсулину, МЕ/мл AutoAB to Insulin, ME/ml	0	4,2 (4,17-4,30)	3,4 (3,3-3,4)	9,4 (9,30-9,55) p ₁ < 0,005 p ₂ < 0,01	8,4 (8,25-8,58) p ₁ < 0,005
АутоАТ к собственным компонентам поджелудочной железы, МЕ/мл AutoAB to own pancreatic components, ME/ml	0	0,2 (0,17-0,20)	0,12 (0,10-0,12)	4,6 (4,45-4,75) p ₁ < 0,005 p ₂ < 0,01	3,7 (3,6-4,1) p ₁ < 0,005
IgA, г/л g/l	2,1 (1,8-2,2)	5,6 (5,6-5,8) p < 0,005	4,6 (4,4-4,7) p < 0,005	6,4 (6,25-6,55) p < 0,001 p ₁ < 0,01 p ₂ < 0,01	6,0 (5,65-6,15) p < 0,001 p ₁ < 0,001
IgM, г/л g/l	2,1 (1,8-2,2)	1,7 (1,7-1,8)	1,5 (1,4-1,6)	3,25 (3,10-3,37) p ₁ < 0,005	2,9 (2,65-3,00)
IgG, г/л g/l	11 (9-12)	18 (18-20) p < 0,005	14 (14-18) p < 0,005	23 (22-24) p < 0,001 p ₁ < 0,005 p ₂ < 0,01	19 (18-20) p < 0,005

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Список литературы / References

1. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Герасимов Г.А. Клинические рекомендации Российской ассоциации эндокринологов по диагностике и лечению аутоиммунного тиреоидита у взрослых // Проблемы эндокринологии, 2003. № 6 (49). С. 50-54. [Dedov I.I., Melnichenko G.A., Gerasimov G.A. Clinical recommendations of the Russian Association of Endocrinologists on the diagnosis and treatment of autoimmune thyroiditis in adults. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2003, no. 6 (49), pp. 50-54. (In Russ.)]
2. Иванова Г.П., Горобец Л.Н. Современные представления об особенностях клинко-психопатологических и иммуноэндокринных взаимодействий при аутоиммунном тиреоидите. Часть 1 // Социальная и клиническая психиатрия, 2010. Т. 20, № 4. С. 117-124. [Ivanova G.P., Gorobets L.N. Modern ideas about the features of clinical, psychopathological and immunoendocrine interactions in autoimmune thyroiditis. Part 1. *Sotsialnaya i klinicheskaya psikhiatriya = Social and Clinical Psychiatry*, 2010, Vol. 20, no. 4, pp. 117-124. (In Russ.)]
3. Комисаренко Ю.И., Бобрик М.И. Аутоиммунные нарушения при эндокринной патологии. Новый взгляд на диагностику и менеджмент. По материалам 18th European Congress of Endocrinology (Munich, May 2016) // Международный эндокринологический журнал, 2016. № 4 (76). С. 41-44. [Komisarenko Yu.I., Bobrik M.I. Autoimmune disorders in endocrine pathology. New view on diagnostics and management. According to the materials of the 18th European Congress of Endocrinology (Munich, May 2016). *Mezhdunarodnyy endokrinologicheskij zhurnal = International Endocrinological Journal*, 2016, no. 4 (76), pp. 41-44. (In Russ.)]
4. Ларина А.А., Трошина Е.А. Аутоиммунные заболевания, ассоциированные с сахарным диабетом 1-го типа: возможное взаимовлияние // Проблемы эндокринологии, 2013. № 1. С. 35-42. [Larina A.A., Troshina E.A. Autoimmune diseases associated with type 1 diabetes mellitus: a possible interaction. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2013, no. 1, pp. 35-42. (In Russ.)]
5. Ляшенко Е.А. Современные представления об аутоиммунной патологии щитовидной железы (обзор литературы) // Актуальные проблемы транспортной медицины, 2013. № 4 (34). С. 37-46. [Lyashenko E.A. Modern ideas about the autoimmune pathology of the thyroid gland (literature review). *Aktualnyye problemy transportnoy meditsiny = Actual Problems of Transport Medicine*, 2013, no. 4 (34), pp. 37-46. (In Russ.)]
6. Рымар О.Д., Микитинская А.К., Максимов В.Н., Мустафина С.В. Роль генетических факторов в этиологии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2011. Т. 26, № 4 (2). С. 34-41. [Rymar O., Mikitinskaya A.K., Maksimov V.N., Mustaphina S.V. The role of genetic factors in the etiology of autoimmune diseases of the thyroid gland. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2011, Vol. 26, no. 4 (2), pp. 34-41. (In Russ.)]
7. Рымар О.Д., Пьянкова А.К., Максимов В.Н., Мустафина С.В. Семейные случаи аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // Клиническая и экспериментальная тиреоидология, 2013. Т. 9, № 4. С. 39-45. [Rymar O.D., Pyankova A.K., Maksimov V.N., Mustafina S.V. Family cases of autoimmune diseases of the thyroid gland. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya tireodologiya = Clinical and Experimental Thyroidology*, 2013, Vol. 9, no. 4, pp. 39-45. (In Russ.)]
8. Шагарова С.Г. К проблеме иммунопатогенеза аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2011. Т. 100, № 1. С. 42-45. [Shagarova S.G. To the problem of immunopathogenesis of autoimmune diseases of the thyroid gland. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2011, Vol. 100, no. 1, pp. 42-45. (In Russ.)]
9. Dittmar M., Libich C., Brenzel T. Increased familial clustering of autoimmune thyroid diseases. *Horm. Metab. Res.*, 2011, Vol. 43, no. 3, pp. 200-204.
10. Manji N., Carr-Smith J.D., Boelaert K., Allahabadia A., Armitage M., Chatterjee V.K., Lazarus J.H., Pearce S.H., Vaidya B., Gough S.C., Franklyn J.A. Influences of age, gender, smoking, and family history on autoimmune thyroid disease phenotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006, Vol. 91, no. 12, pp. 4873-4880.
11. Tomer Y., Davies T.F. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. *Endocr. Rev.*, 2003, Vol. 24, no. 5, pp. 694-717.
12. Vanderpump M.P. The epidemiology of thyroid disease. *Br. Med. Bull.*, 2011, Vol. 99, pp. 39-51.

Авторы:

Болотская Л.А. — д.м.н., доцент, профессор кафедры патофизиологии и общей патологии медицинского института БУ ВО Ханты-Мансийского автономного округа — Югры «Сургутский государственный университет», г. Сургут, Россия

Тарлюн А.А. — аспирантка кафедры патофизиологии и общей патологии медицинского института БУ ВО Ханты-Мансийского автономного округа — Югры «Сургутский государственный университет», г. Сургут, Россия

Authors:

Bolotskaya L.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor of Department of Pathophysiology and General Pathology, Medical Institute, Surgut State University, Surgut, Khanty-Mansiysk Autonomous District, Russian Federation

Tarlyun A.A., Postgraduate Student, Department of Pathophysiology and General Pathology, Medical Institute, Surgut State University, Surgut, Khanty-Mansiysk Autonomous District, Russian Federation

Поступила 25.04.2019
Принята к печати 29.04.2019

Received 25.04.2019
Accepted 29.04.2019

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОМЕНА МАКРОТИРОТРОПИНИИ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ И СУБКЛИНИЧЕСКИМ ГИПОТИРЕОЗОМ

Биктагирова Э.М.¹, Вагапова Г.Р.², Семаков Г.П.¹,
Золотоверхова Н.И.², Невзорова Т.А.¹, Андрианова И.А.¹,
Евтюгина Н.Г.¹, Акберова Н.И.¹, Хисамутдинов А.Н.³, Абрамова З.И.¹

¹ ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

² ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

³ ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Резюме. Уровень тиреотропного гормона является одним из диагностических показателей функции щитовидной железы. При субклиническом гипотиреозе его концентрация в сыворотке крови повышается, тогда как уровень гормонов щитовидной железы остается в норме. Одна из причин этого — феномен макротиротропинемии, при котором в крови присутствуют макроизоформы тиреотропина (комплекс тиреотропного гормона с иммуноглобулином). Предполагается, что биологическая активность макротиротропина низкая и может накапливаться в циркуляции, вызывая ложноповышенный уровень тиреотропного гормона в сыворотке.

Данное исследование направлено на выявление природы и характер распространенности феномена макротиротропинемии среди больных субклиническим гипотиреозом на фоне аутоиммунного тиреоидита и группы здоровых доноров.

Материалом для исследования служили 50 образцов сывороток венозной крови: 30 пациентов с субклиническим гипотиреозом на фоне аутоиммунного тиреоидита, 10 с манифестным гипотиреозом, 10 условно здоровых доноров без патологий щитовидной железы (группа контроля). Выборка была сформирована на базе клинической лаборатории при НУЗ «Отделенческая клиническая больница на ст. Казань ОАО «РЖД», г. Казань. Сыворотка крови больных была подвергнута скринингу на наличие макротиротропина методом полиэтиленгликоль-преципитации с последующим анализом ее гель-фильтрационной хроматографией.

В результате проведения скрининга сывороток крови методом гель-фильтрационной и аффинной хроматографии установлено, что полиэтиленгликоль осаждает от 50 до 100% сывороточного тиреотропина, из которого 56-98% — истинный макротиротропин. У пациентов с субклиническим гипо-

Адрес для переписки:

Биктагирова Эльнара Маулетовна
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ
420008, Россия, Республика Татарстан, г. Казань,
ул. Кремлевская, 18.
Тел.: 8 (987) 069-83-58.
Факс: 8 (843) 233-78-14.
E-mail: elnarabik@gmail.com

Address for correspondence:

Biktagirova Elnara M.
Kazan (Volga) Federal University
420008, Russian Federation, Republic of Tatarstan, Kazan,
Kremlevskaya str., 18.
Phone: 7 (987) 069-83-58.
Fax: 7 (843) 233-78-14.
E-mail: elnarabik@gmail.com

Образец цитирования:

Э.М. Биктагирова, Г.Р. Вагапова, Г.П. Семаков, Н.И. Золотоверхова, Т.А. Невзорова, И.А. Андрианова, Н.Г. Евтюгина, Н.И. Акберова, А.Н. Хисамутдинов, З.И. Абрамова «Определение феномена макротиротропинемии у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом и субклиническим гипотиреозом» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1063-1072. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1063-1072
© Биктагирова Э.М. и соавт., 2019

For citation:

E.M. Biktagirova, G.R. Vagapova, G.P. Semakov, N.I. Zolotoverkhova, T.A. Nevzorova, I.A. Andrianova, N.G. Evtugina, N.I. Akberova, A.N. Khisamutdinov, Z.I. Abramova "Detection of macro-thyrotropinaemia in patients with Hashimoto's thyroiditis and subclinical hypothyroidism", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1063-1072. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1063-1072
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1063-1072

тиреозом, с уровнем тиреотропного гормона более 10 мкМЕ/мл, показана тенденция к увеличению уровня макротиротропина. Содержание макротиротропинового комплекса у пациентов с субклиническим гипотиреозом, у которых уровень антител к тиреопероксидазе > 500 ед/л, достоверно выше по сравнению с пациентами с манифестным гипотиреозом. Повышенный уровень антител к тиреопероксидазе может приводить к генерации макротиротропина.

Наше исследование показало феномен макротиротропинемии достаточно часто встречается как у пациентов с субклиническим и манифестным гипотиреозом на фоне тиреоидита Хашимото (53,3%), так и в группе контроля (25%). Макротиротропиновый комплекс, вероятно, состоит из тиреотропина и IgG. Пациенты с уровнем тиреотропного гормона более 10 мкМЕ/мл являются кандидатами для проведения скрининга на наличие макротиротропинового комплекса. Активность аутоиммунного процесса может коррелировать с феноменом макротиротропинемии. Полученные результаты могут быть использованы для разработки дополнительного инструмента при выборе терапии в клинической практике.

Ключевые слова: макротиротропинемия, аутоиммунный тиреоидит, субклинический гипотиреоз, гель-фильтрационная хроматография, аффинная хроматография

DETECTION OF MACRO-THYROTROPINAEMIA IN PATIENTS WITH HASHIMOTOS THYROIDITIS AND SUBCLINICAL HYPOTHYROIDISM

Biktagirova E.M.^a, Vagapova G.R.^b, Semakov G.P.^a,
Zolotoverkchova N.I.^b, Nevzorova T.A.^a, Andrianova I.A.^a,
Evtyugina N.G.^a, Akberova N.I.^a, Khisamutdinov A.N.^c, Abramova Z.I.^a

^a Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

^b Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

^c Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abstract. The level of thyroid stimulating hormone is one of the diagnostic indicators of thyroid function. In subclinical hypothyroidism, its concentration in the blood serum increases, while the level of thyroid hormones remains normal. One of the reasons for this is the phenomenon of macrotyrotropinemia, in which the macro isoforms of thyrotropin (a complex of thyrotropic hormone with immunoglobulin) are present in the blood. It is assumed that the biological activity of macrotyrotropin is low, and may accumulate in the circulation, causing a falsely elevated level of thyroid-stimulating hormone in serum. The aim of this study is to identify the nature and prevalence of the macrothyrotropinemia phenomenon among patients with subclinical hypothyroidism in presence of autoimmune thyroiditis and a group of healthy donors. Materials and methods: Fifty serum samples of venous blood served as the material for the study: 30 patients with subclinical hypothyroidism in presence of autoimmune thyroiditis; 10, with manifesting hypothyroidism, 10 conditionally healthy donors without thyroid gland pathology (control group). The group was derived from results of the clinical laboratory at the Clinical Hospital at the Kazan station railway. Patients' blood serum was screened for the presence of macrotyrotropin by polyethylene glycol precipitation method, followed by analysis by gel filtration chromatography. Results of this study were as follows: screening of blood sera was performed by gel filtration and affinity chromatography. Polyethylene glycol was shown to precipitate 50 to 100% serum thyrotropin, of which true macrothyrotropin makes 56-98%. In the patients with subclinical hypothyroidism with a thyroid-stimulating hormone level of more than 10 μ IU/ml, a trend towards an increase in the level of macrothyrotrophinaemia has been shown. The content of macrotyrotropin complex in patients with subclinical hypothyroidism, in whom the level of antibodies to thyroperoxidase is > 500 U/L, is significantly higher if compared to the patients with manifesting hypothyroidism. Elevated levels of antibodies to thyroperoxidase can lead to the generation of macrotyrotropin. Our findings have shown that the phenomenon of macrothyrotropinemia is quite common in patients with subclinical and manifesting hypothyroidism with Hashimoto thyroiditis (53.3%) and in control group (25%). Macrotyrotropin complex probably consists of thyrotropin and IgG. Patients with a thyroid-stimulating hormone level of > 10 μ IU/ml are candidates for screening for the presence of the macrotyrotropin complex.

The activity of the autoimmune process may correlate with the phenomenon of macrothyrotropinemia. The results can be used to develop an additional tool when choosing therapy in clinical practice.

Keywords: macrothyrotropinaemia, thyroiditis, autoimmune hypothyreosis, subclinical, gel-filtration chromatography, affine chromatography

Введение

Тиреотропный гормон (тиреотропин; ТТГ) является ключевым параметром для оценки состояния щитовидной железы (ЩЖ) [12]. В зависимости от клинических и лабораторных проявлений выделяют два варианта течения гипотиреоза: манифестный и субклинический [17]. Субклинический гипотиреоз диагностируется при условии, когда определяется нормальный уровень свободного трийодтиронина (св. Т4) в сочетании с умеренно повышенным уровнем ТТГ. Заместительная терапия тиреоидными гормонами, как правило, начинается при уровне ТТГ, превышающем 10 мЕд/л [2, 4, 7].

В настоящее время в литературе обсуждается феномен макропролактинемии [1, 6], при этом биологическая активность макропролактина (макро-ПРЛ) (комплекс пролактина и иммуноглобулина) низкая [1]. По аналогии с макропролактинемией встречаются случаи, когда в крови циркулируют макроизоформы других гормонов, в частности гонадотропинов [11]. Так, в литературе описан феномен макро-ТТГ, при котором в крови присутствуют макроизоформы ТТГ, значительно повышен уровень ТТГ без повышения св. Т4 и клинических проявлений [16]. Молекула макро-ТТГ представляет собой комплекс ТТГ с иммуноглобулином G (IgG) большого молекулярного размера [7]. Предполагается, что биологическая активность макро-ТТГ может быть такой же низкой, как и у макро-ПРЛ, при этом макро-ТТГ может накапливаться в циркуляции, вызывая ложноповышенный уровень ТТГ в сыворотке. Таким образом, макро-ТТГ, вероятно, обнаруживается у пациентов с субклиническим гипотиреозом. Анализ результатов определения уровня ТТГ часто проводится с использованием иммунометрических методов и не лишен недостатков. Определение биохимической основы феномена макро-ТТГ позволит дифференцировать ложное повышение уровня ТТГ вследствие присутствия гетерофильных антител (АТ) от повышения концентрации гормона, обусловленного снижением функции ЩЖ. Определение макро-ТТГ играет важную роль в клинической практике, так как может изменить терапевтическую стратегию для пациентов с субклиническим гипотиреозом [7].

Определение биохимической основы феномена макро-ТТГ позволит усовершенствовать алгоритм диагностики и лечения субклинического

гипотиреоза [1, 7]. На сегодняшний день распространенность феномена макро-ТТГ в общей популяции остается неизученной [11].

В данном исследовании мы проверили нашу гипотезу, изучив распространенность макро-ТТГ у пациентов с субклиническим гипотиреозом и природу макро-ТТГ. Таким образом, **целью данной работы** была оценка частоты встречаемости феномена макро-ТТГ и характеристика процентного соотношения клинического показателя ТТГ и связанного комплекса ТТГ с IgG (ТТГ + IgG) для пациентов с субклиническим гипотиреозом на фоне аутоиммунного тиреоидита (АИТ, тиреоидит Хашимото). Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оптимизировать метод выделения макро-ТТГ из сывороток крови контрольной группы и больных субклиническим и манифестным гипотиреозом на фоне АИТ.
2. Изучить состав макро-ТТГ методом аффинной хроматографии на Protein G-сефарозе и гель-фильтрации на суперозе 12.
3. Установить характер и уровень зависимости между частотой встречаемости макро-ТТГ, уровнем св. Т4 и активностью аутоиммунного процесса (уровень АТ к тиреопероксидазе (АТ к ТПО)).

Материалы и методы

Скрининг макро-ТТГ осуществлялся на 50 образцах сывороток венозной крови (из них пациентов с субклиническим гипотиреозом на фоне АИТ (ТТГ выше верхней границы нормы, свободный Т4 в референсном интервале, св. Т4 = $11,69 \pm 1,07$ пмоль/л) — 30, с манифестным гипотиреозом — 10, условно здоровых донора без патологий ЩЖ (группа контроля) — 10), полученной из клинической лаборатории при НУЗ «Отделенческая клиническая больница на ст. Казань ОАО „РЖД“», г. Казань (табл. 1). Во всех образцах сывороток крови пациентов с субклиническим гипотиреозом на фоне АИТ и манифестным гипотиреозом отмечался повышенный уровень антитиреоидных аутоантител (АТ к тиреопероксидазе (АТ к ТПО)).

Диагноз «АИТ» устанавливался на основании общепринятых лабораторно-инструментальных исследований: результатов ультразвукового исследования и оценки функционального состояния ЩЖ, по содержанию ТТГ, свободного тироксина (св. Т3), св. Т4 и определения титра АТ к ТПО в сыворотке крови. Диагноз «субклиниче-

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS

Диагноз Diseases	Возраст Age	Уровень св. Т4 (пмоль/л) Free T4 (pmol/l)	Уровень АТ к ТПО (Ед/л) TPOAb (IU/l)	Уровень ТТГ (мкМЕ/мл) Serum TSH (μIU/ml)	Св.ТТГ*** (мкМЕ/ мл) Free TSH (μIU/ml)	ТТГ в осадке**** PEG prep TSH (%)	ТТГ + IgG***** TSH + IgG (%)
Субклинический гипотиреоз (№ 1)* Subclinical hypothyroidism (No. 1)* n = 10	58,90±14,93	11,26±1,29	243,67±223,50	5,53±1,07	2,64±0,83	53,4±16,9	22,4±7,1
Субклинический гипотиреоз (№ 2) Subclinical hypothyroidism (No. 2) n = 10			465,89±89,04	12,26±1,30	2,07±0,65	83,6±26,4	56,4±17,8
Субклинический гипотиреоз (№ 3) Subclinical hypothyroidism (No. 3) n = 10			> 500	34,10±16,79	3,42±1,08	93,34±29,50	24,4±7,8
Манифестный гипотиреоз Manifest hypothyroidism n = 10	55,2±13,2	8,93±1,01	377,38±223,90	30,2±24,8	3,20±1,01	0,88±0,28	16,52±5,23
Контроль Control n = 10	54,80±14,83	14,41±1,70	в пределах нормы** normal**	1,56±0,24	0,89±0,28	55,4±17,5	39,52±12,50

Примечание. * – в зависимости от уровня ТТГ пациенты были поделены на 3 группы: № 1 – ТТГ 4,0-10,0 мкМЕ/мл; № 2 – ТТГ 10,0 – 15,0 мкМЕ/мл; № 3 – ТТГ выше 15,0 мкМЕ/мл. ** – референсные критерии: ТТГ 0,3-4,0 мкМЕ/мл, св Т4 10,2-23,2 пмоль/л, АТ к ТПО 0,0-30,0 Ед/л. *** – свободный ТТГ в супернатанте после 12,5% ПЭГ (полиэтиленгликоль)-преципитации. **** – ТТГ в осадке = (исходный ТТГ – ТТГ в супернатанте) / исходный ТТГ × 100%. ***** – ТТГ + IgG (ТТГ связанный с IgG) = ТТГ в комплексе с IgG (связанный с PrG сефарозой) / (свободный ТТГ + ТТГ в комплексе с IgG) × 100%.

Note. *, depending on the level of TSH, the patients were divided into 3 groups: No. 1 – TSH 4.0-10.0 μIU/ml; No. 2 – TSH 10.0-15.0 μIU/ml; No. 3 – TSH above 15.0 μIU/ml. **, reference criteria: TSH 0.3-4.0 μIU/ml, fT4 10.2-23.2 pmol/l, TPOAb 0.0-30.0 IU/l. ***, ratio of free TSH in supernatant after 12.5% PEG (polyethylene glycol)-precipitable. **** PEG prep TSH = (Serum TSH – free TSH in supernatant) / Serum TSH × 100%. *****, TSH + IgG = TSH bound IgG (PrG sepharose bound) / (free TSH + TSH bound IgG) × 100%.

ский гипотиреоз» устанавливался по уровню ТТГ выше верхней границы нормы и св. ТЗ в интервале референсных значений.

Все лица, включенные в исследование, дали информированное согласие на участие в нем.

Концентрация ТТГ в сыворотках крови пациентов определялась методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов реагентов для количественного иммуноферментного определения тиреотропного гормона в сыворотке крови человека «Тиротид ИФА-ТТГ» (ООО «Алкор Био»,

Санкт-Петербург) согласно инструкции фирмы-производителя.

Для идентификации макро-ТТГ использовался метод осаждения иммунных комплексов полиэтиленгликолем (ПЭГ). Для этого равные объемы сыворотки крови пациентов (200 мкл) смешивались с 12,5% ПЭГ 6000 (Merck, Schuchardt) на фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH = 6,8) и инкубировались 24 часа при +4 °С с дальнейшим центрифугированием при 3000 g в течение 5 мин [16]. В полученном супернатанте измеряли уровень ТТГ, осадок разводили 0,1М глициновым

буфером (0,1М глицин-HCl, pH = 2,3), в котором также измеряли уровень ТТГ методом ИФА.

Полученный осадок иммунных комплексов растворяли в ФСБ и исследовали гель-фильтрационной (Superose 12 10/300) и аффинной хроматографией (HiTrap Protein G HP).

Гель-фильтрационная хроматография проводилась на колонке с суперозой 12 (superose 12 10/300 GL) (GE Healthcare, Швеция). На колонку наносили 500 мкл образца иммунных комплексов (осадок, содержащий ТТГ и IgG), растворенных в ФСБ, с последующей элюцией биомолекул ФСБ (pH 7,4) [5, 7, 14, 16]. Колонка superose 12 10/300 GL была откалибрована маркерами с различными молекулярными массами. Детекцию ТТГ проводили при 280 нм. В полученных фракциях проводили анализ содержания ТТГ методом ИФА.

Для аффинной хроматографии использовали колонку с HiTrap Protein G HP (GE Healthcare, Швейцария), на которую наносили 0,5-2 мг образца иммунных комплексов (осадок, содержащий ТТГ и IgG) и последовательно промывали колонку со скоростью 1 мл/мин: ФСБ для элюции не связывающихся биомолекул и 0,1 М глицин-HCl (pH 2,3) для элюции связавшегося IgG с Protein G. Элюированные пробы сразу нейтрализовали буфером 1 М ТрисNaOH (pH = 10,4). В полученных фракциях анализировали содержание ТТГ методом ИФА.

Статистическая обработка данных проводилась в статистической среде R с использованием программы RStudio. Данные представлены в виде Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), графически боксплотами. Нормальность распределения признаков определя-

ли по критерию Шапиро-Уилка. Для сравнения вариантов использовали критерии Краскела-Уоллиса, для последующего попарного сравнения применяли ранговый критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони, для выявления различия в вариабельности признаков использовали F-критерий Фишера [2].

Результаты

В ходе исследования осаждение ПЭГ-6000 показало низкую восстановительную способность ТТГ, что может указывать на присутствие в полученном ПЭГ-6000 осадке связанных с ТТГ крупных молекул, таких как IgG [5, 7, 14, 16]. У 8 пациентов с субклиническим гипотиреозом результаты гель-фильтрационной хроматографии показали, что пик иммунореактивности ТТГ с молекулярной массой 28 кДа располагался на хроматограмме правее пика выхода IgG, молекулярная масса которого составляла 150 кДа (рис. 1А). В полученных после проведения хроматографии пробах была определена концентрация ТТГ методом ИФА и соотнесена с полученными пиками на графике. Максимальная концентрация ТТГ приходилась на объем, равный 11 мл, что соответствовало пику выхода IgG (рис. 1Б). Это свидетельствовало о том, что в данных комплексах содержался как свободный ТТГ, так и макро-ТТГ комплекс.

Также были проанализированы образцы, не содержащие комплекс ТТГ с IgG (рис. 1Б)

Для доказательства наличия комплекса ТТГ с IgG в сыворотке крови больных была проведена аффинная хроматография на протеин G-сефарозе, поскольку Fc-фрагмент челове-

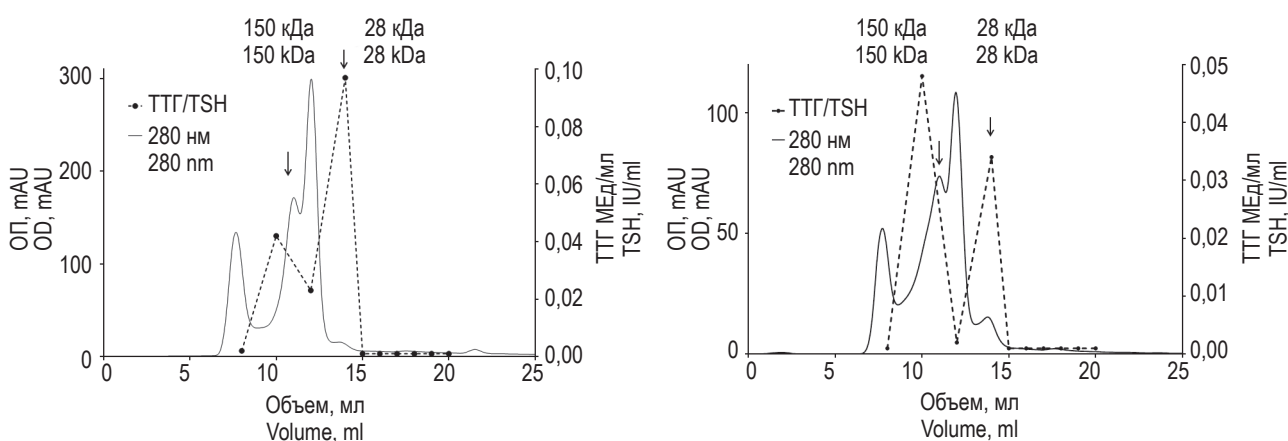


Рисунок 1. Измерение ТТГ во фракциях с использованием гель-фильтрационной хроматографии

Примечание. Основной пик иммунореактивности ТТГ был показан в виде молекулярной массы 28 кДа, тогда как фракция другого пика ТТГ обнаруживалась в виде молекулярной массы 150 кДа.

Figure 1. Measure TSH in fractions using GFC

Note. The main peak of TSH immunoreactivity was shown as a molecular weight of 28 kDa, while a fraction of the other TSH peak was detected as a molecular weight of 150 kDa.

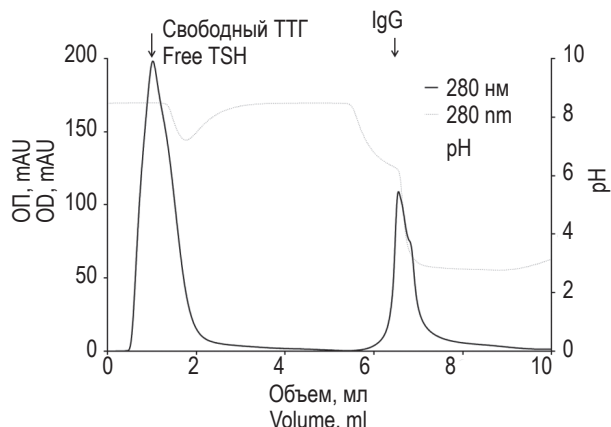


Рисунок 2. Показано 2 пика, первый соответствует несвязанным биомолекулам, второй – IgG

Примечание. Полученные пики были собраны и проанализированы на содержание ТТГ методом ИФА. Максимальная концентрация ТТГ наблюдалась во втором пике, из этого следует, что ТТГ связан с IgG.

Figure 2. Shown 2 peaks, the first corresponds to unbound biomolecules, the second – IgG

Note. The resulting peaks were collected and analyzed for the content of TSH by ELISA. The maximum concentration of TSH was observed in the second peak, it follows that TSH is associated with IgG.

ского IgG имеет большое сродство к протеин G-сефарозе (рис. 2.) [5].

Статистический анализ данных показал, что ПЭГ осаждает от 50 до 100% сывороточного ТТГ, из которого от 56 до 98% – истинный макро-ТТГ (табл. 1). Таким образом, можно предположить, что данные диагностических лабораторий по определению концентрации ТТГ методом ИФА могут быть ложноположительными, и, как следствие, пациент получает неадекватное лечение [16]. Расчет показал, что во всех сыворотках больных субклиническим гипотиреозом присутствует ТТГ, связанный с IgG, следовательно, имеет место феномен макро-ТТГ

Для определения распространенности феномена макро-ТТГ был проведен сравнительный анализ трех групп: пациентов (с субклиническим и манифестным гипотиреозами на фоне АИТ) и условно здоровых доноров по процентному содержанию макро-ТТГ в исходной сыворотке. Была показана тенденция к снижению уровня комплекса ТТГ + IgG в группе больных манифестным гипотиреозом 13,37% (5,13-27,56) по сравнению с контрольной группой 43,06% (14,3-54,38) и больных субклиническим гипотиреозом 21,74% (4,21-60,27) ($p = 0,228$) (рис. 3). Распространенность феномена макро-ТТГ среди пациентов с субклиническим и манифестным гипотиреозом является достаточно высокой и составляет 53,33% (22 случая из 40).

У группы контроля в 25% случаев (4 случая из 10) также выявлен макрокомплекс ТТГ + IgG,

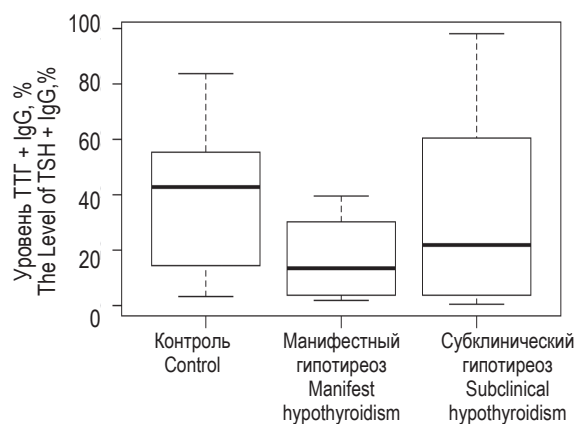


Рисунок 3. Распределение уровня ТТГ + IgG,% среди групп контроля и пациентов с субклиническим и манифестным гипотиреозом

Примечание. Сравнительный анализ трех групп: пациентов (с субклиническим и манифестным гипотиреозами на фоне АИТ) и условно здоровых доноров по процентному содержанию макро-ТТГ в исходной сыворотке. Показана тенденция к снижению уровня комплекса ТТГ + IgG в группе больных манифестным гипотиреозом 13,37% (5,13-27,56) по сравнению с контрольной группой 43,06% (14,3-54,38) и больных субклиническим гипотиреозом 21,74% (4,21-60,27) ($p = 0,228$). Данные уровня макро-ТТГ представлены боксплотами. Каждый столбец представляет интерквартильный размах, где верхняя граница – 75-ый перцентиль, нижняя – 25-ый перцентиль, жирная черта – медиана. Верхняя и нижняя граница разброса – $1,5 \times$ интерквартильный размах.

Figure 3. Distribution of TSH bound IgG levels, % among control groups and patients with subclinical and manifest hypothyroidism

Note. Distribution of TSH bound IgG levels, % among control groups and patients with subclinical and manifest hypothyroidism. The tendency to a decrease in the level of the macroTSH in the group of patients with manifest hypothyroidism of 13.37% was shown (5.13-27.56) compared with the control group 43.06% (14.3-54.38) and patients with subclinical hypothyroidism 21.74% (4.21-60.27) (p value = 0.228). The data of the level of macroTSH are represented by boxplots. Each column represents the interquartile range, where the upper boundary is the 75th percentile, the lower boundary is the 25th percentile, and the bold line is the median. The upper and lower scatter limits are $1.5 \times$ interquartile range.

что свидетельствует о возможности существования феномена макротиротропинемии среди здоровых лиц.

Для определения зависимости между содержанием макрокомплекса ТТГ + IgG и уровнем ТТГ группы исследуемых пациентов были разделены на 3 подгруппы в зависимости от уровня ТТГ (№ 1 – ТТГ 4,0-10,0 мкМЕ/мл; № 2 – ТТГ 10,0-15,0 мкМЕ/мл; № 3 – ТТГ выше 15,0 мкМЕ/мл). Сравнительный анализ данных подгрупп показал тенденцию к увеличению уровня макро-ТТГ у пациентов с субклиническим гипотиреозом в подгруппе № 2 60,42% (33,18-91,55) по сравнению с группами № 1 и № 3 (6,82% (1,84-43,96) vs

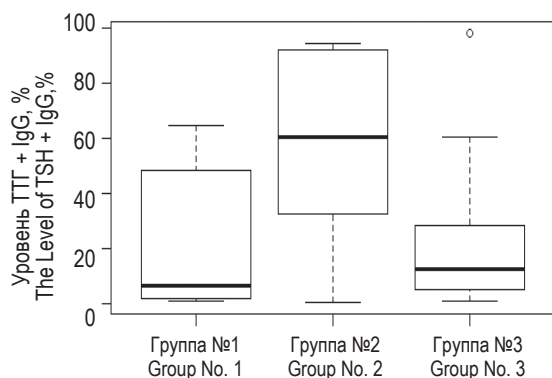


Рисунок 4. Распределение уровня ТТГ + IgG, % в группе пациентов с субклиническим гипотиреозом в зависимости от концентрации ТТГ сыворотки крови
Примечание. Сравнительный анализ групп пациентов по уровню ТТГ + IgG, % с субклиническим гипотиреозом в зависимости от концентрации ТТГ сыворотки крови (№ 1 – 4,0-10,0 мкМЕ/мл; № 2 – 10,0-15,0 мкМЕ/мл; № 3 – выше 15,0 мкМЕ/мл). Наибольшая встречаемость комплекса макро-ТТГ показана в подгруппах № 2 и № 3 (ТТГ 10,0-15,0 мМЕ/л и выше ТТГ 15,0 мМЕ/л). Данные уровня макро-ТТГ представлены боксплотами. Каждый столбец представляет интерквартильный размах, где верхняя граница – 75-ый перцентиль, нижняя – 25-ый перцентиль, жирная черта – медиана. Верхняя и нижняя граница разброса – 1,5 × интерквартильный размах.

Figure 4. Distribution of the level of TSH bound IgG, % in the group of patients with subclinical hypothyroidism depending on the serum TSH concentration

Note. Comparative analysis of patient groups according to the level of TSH bound IgG, % in the group of patients with subclinical hypothyroidism depending on the serum TSH concentration (No. 1 – 4,0-10,0 μ U/ml; No. 2 – 10,0-15,0 μ U/ml; No. 3 – above 15,0 μ U/ml). The highest occurrence of the macroTSH complex is shown in subgroups No. 2 and No. 3. Each column represents the interquartile range, where the upper boundary is the 75th percentile, the lower boundary is the 25th percentile, and the bold line is the median. The upper and lower scatter limits are 1.5 × interquartile range.

12.785 (5,57-25,15)) (рис. 4) ($p = 0,06$) (тест Вилкоксона с поправкой Бонферрони).

В 16 образцах сыворотки крови из 30 пациентов с АИТ и субклиническим гипотиреозом выявлен комплекс ТТГ + IgG, что соответствует 53,33% и свидетельствует о высокой распространенности феномена макротиротропинемии. Шесть сывороток с выявленным макрокомплексом соответствовали повышению уровня ТТГ в пределах 4,0-10,0 мкМЕ/мл (№ 1). В подгруппе № 2 (ТТГ 10,0-15,0 мкМЕ/мл) выявлено также 6 образцов с комплексом ТТГ + IgG, в подгруппе № 3 (ТТГ выше 15,0 мкМЕ/мл) – в четырех сыворотках. Наибольшая встречаемость комплекса макро-ТТГ наблюдалась в подгруппах № 2 и № 3 (ТТГ 10,0-15,0 мМЕ/л и выше ТТГ 15,0 мМЕ/л).

Для определения зависимости распространенности феномена макротиротропинемии от ак-

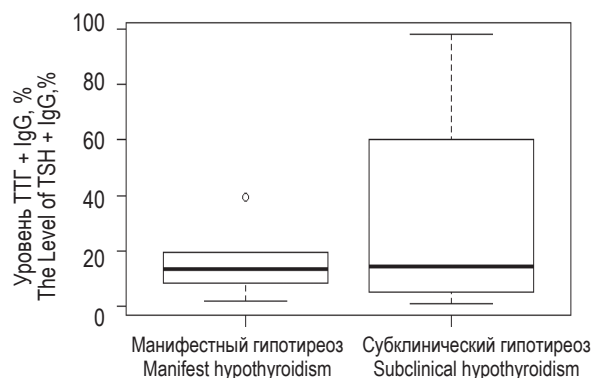


Рисунок 5. Распределение уровня ТТГ + IgG, % между группами пациентов с субклиническим и манифестным гипотиреозом по содержанию АТ к ТПО > 500 Ед/л

Примечание. Сравнительный анализ пациентов по уровню ТТГ + IgG, % между группами с субклиническим и манифестным гипотиреозом по содержанию АТ к ТПО > 500 Ед/л. Показано, что вариабельность содержания макро-ТТГ достоверно меньше у пациентов с манифестным гипотиреозом по сравнению с субклиническим гипотиреозом (13,37 (9,53-17,99) vs 14,3 (5,3-54,11), $p = 0,049$). Данные уровня макро-ТТГ представлены боксплотами. Каждый столбец представляет интерквартильный размах, где верхняя граница – 75-ый перцентиль, нижняя – 25-ый перцентиль, жирная черта – медиана. Верхняя и нижняя граница разброса – 1,5 × интерквартильный размах.

Figure 5. Distribution of the level of TSH bound IgG, % between groups of patients with subclinical and manifest hypothyroidism according to the content of to TPO Ab > 500 IU/l

Note. Comparative analysis of patients by the level of TSH bound IgG, % between groups with subclinical and manifest hypothyroidism in the content of antibodies to TPO > 500 IU/l. It was shown that the variability of the content of macroTSH was significantly less in patients with manifest hypothyroidism compared with subclinical hypothyroidism (13.37 (9.53-17.99) vs 14.3 (5.3-54.11), $p = 0.049$). Each column represents the interquartile range, where the upper boundary is the 75th percentile, the lower boundary is the 25th percentile, and the bold line is the median. The upper and lower scatter limits are 1.5 × interquartile range.

тивности аутоиммунного процесса пациенты были разделены на группы по уровню АТ к ТПО (№ 1 АТ к ТПО 30,0-500,0 Ед/л; № 2 АТ к ТПО выше 500,0 Ед/л).

Статистический анализ данных по процентному содержанию макрокомплекса ТТГ + IgG у пациентов двух групп (пациенты с манифестным и субклиническим гипотиреозом) по содержанию АТ к ТПО более 500 Ед/л показал, что вариабельность содержания макро-ТТГ достоверно меньше у пациентов с манифестным гипотиреозом по сравнению с субклиническим гипотиреозом (13,37 (9,53-17,99) vs 14,3 (5,3-54,11), $p = 0,049$). Таким образом, исходя из вышеизложенного, можно предположить, что активность аутоиммунного процесса может коррелировать с феноменом макро-ТТГ.

Обсуждение

Диагностика макро-ТТГ очень важна для клиники, так как ее результат может повлиять на тактику лечения для пациентов с субклиническим гипотиреозом.

Аналогично макро-ПРЛ, наши результаты показали, что макро-ТТГ, вероятно, состоит из ТТГ и IgG. Во всех образцах наряду с макрокомплексами обнаружены как мономерный ТТГ, так и свободный от связи с IgG.

В норме молекула ТТГ имеет низкий молекулярный вес (28 кДа) и легко проникает через почечный барьер, выходясь из организма. Учитывая, что молекулярный вес комплекса ТТГ с IgG значительно превышает молекулярный вес ТТГ (150 кДа), проникнуть сквозь почечный барьер макро-ТТГ не может и длительно сохраняется в сыворотке крови, что создает значительные помехи при ИФА [16]. У всех пациентов с выявленным макро-ТТГ фоновым заболеванием является АИТ. Можно предположить, что аутоиммунный механизм также принимает непосредственное участие в образовании макрокомплексов.

Полученные результаты согласуются с данными, полученными Sakai и соавт. (2009). Они анализировали пациента с очень высоким уровнем ТТГ, определенным с помощью иммунохемилюминесцентного анализа, без симптомов гипотиреоза и нормальными показателями св. Т3 и св. Т4. В результате изучения состава сыворотки методами гель-фильтрационной и аффинной хроматографии было показано, что пик выхода ТТГ находился в положении выше молекулярной массы, чем у IgG. После проведения ПЭГ-преципитации данный макрокомплекс исчезал на хроматограмме. Таким образом, они пришли к выводу, что ТТГ в сыворотке был представлен в виде комплекса аутоантител к ТТГ и анти-ТТГ IgG [16].

Нами показано, что погрешности при ИФА могут быть обусловлены именно комплексами ТТГ с IgG — макро-ТТГ, которые имеют низкую биологическая активность по сравнению с мономерным ТТГ. Это связано с тем, что комплекс ТТГ с IgG может конкурировать с молекулой ТТГ за связывание с рецептором ТТГ [1, 11]. Hattori и соавт. также показали, что природа макро-ТТГ была гетерогенна, представлена восемью типами аутоантител против ТТГ класса IgG, и обладала низкой биологическую активностью [7].

На сегодняшний день большая часть данных о распространенности феномена макротиротропинемии представлена в работах Hattori и соавт. [6-10]. В одном из исследований они показали, что в 117 образцах из 681 сыворотки пациентов с субклиническим гипотиреозом ПЭГ-осажденного ТТГ превышает 75%, далее

они подвергли полученный комплекс ТТГ гель-фильтрационной хроматографии. Оказалось, что основной пик иммунореактивности ТТГ приходился на массу более 100 кДа, 11 пациентам с субклиническим гипотиреозом был поставлен диагноз «макротиротропинемия», все они имели показатель уровня ТТГ более 10 мкМЕ/л [7].

По нашим данным, наибольшая частота встречаемости комплекса макро-ТТГ наблюдалась у пациентов с уровнем ТТГ более 10,0 мЕд/л. Полученный результат согласуется с результатами скрининга Hattori и соавт. [7]. В другом исследовании Hattori и соавт. также было обнаружено, что у пациентов с тиреоидитом Хашимото без признаков гипотиреоза с уровнем ТТГ выше 40 мЕд/л достоверно чаще встречался феномен макро-ТТГ [3].

В работе 2016 года Hattori и соавт. был проведен скрининг макро-ТТГ 1901 пациента с субклиническим гипотиреозом с помощью ПЭГ-преципитации с последующей гель-фильтрационной хроматографией. У 174 образцов сыворотки крови 75% ТТГ осаждался ПЭГ, в 20 из них содержался ТТГ с большим молекулярным весом. Распространенность феномена макро-ТТГ составила 0,79% (15/1901) [8]. Аналогичная распространенность данного феномена была отмечена в исследовании Mills и соавт. на 495 сыворотках с уровнем ТТГ выше 10 мЕд/мл и составляла 0,6% [15].

Большинство пациентов с субклиническим гипотиреозом в нашем исследовании с высоким уровнем макро-ТТГ также имели высокий уровень сывороточного ТТГ (выше 10 мкМЕ/мл). Это уровень гормона, при котором чаще всего назначается заместительная терапия. Следовательно, пациенты с субклиническим гипотиреозом, у которых уровень ТТГ в сыворотке 10 мкМЕ/мл и более, являются кандидатами на скрининг макро-ТТГ.

Hattori и соавт. в исследовании 2016 года предположили, что феномен макро-ТТГ преобладает в образцах от пожилых пациентов и что аутоиммунные механизмы могут способствовать генерации макро-ТТГ [7].

В заключение следует отметить, что метод осаждения ПЭГ, широко используемый для скрининга макро-ПРЛ, следует ввести и для диагностики макро-ТТГ [1, 6]. Во всех образцах сывороток пациентов после осаждения ПЭГ большая часть ТТГ обнаруживалась именно в осадке, а на гель-фильтрационной хроматографии выявлялись комплексы макро-ТТГ. Это связано с тем, что ТТГ является гликопротеином и, так же как и ПРЛ, может частично гликозилироваться. Предполагается, что гликозилирование может способствовать агрегации гормона, что может привести

к увеличению количества осадка с ПЭГ. Уровень ПЭГ-осажденного ТТГ у пациентов с субклиническим гипотиреозом составил 77%, и феномен макро-ТТГ для них не редкость. Поэтому мы рекомендуем исследовать подробнее на наличие комплексов те образцы, в которых уровень ТТГ после осаждения ПЭГ превышает референсные значения.

Так как макро-ТТГ имеет низкую биологическую активность, пациенты с данным феноменом не нуждаются в заместительной гормональной терапии, кроме пациентов с высоким уровнем

свободного ТТГ в сыворотке. Полученные результаты могут быть использованы для разработки дополнительного инструмента при выборе терапии в клинической практике.

Благодарности

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Список литературы / References

1. Мاستицкий С.Э., Шитиков В.К. Статистический анализ и визуализация данных с помощью R. [Электронный ресурс]: Электронная книга, 2014. 400 с. Режим доступа: <http://r-analytics.blogspot.com> [Mastitsky S.E., Shitikov V.K. Statistical analysis and data visualization using R [Electronic resource]. E-book, 2014. 400 p. Access mode: <http://r-analytics.blogspot.com>.
2. Сорокин М.Ю. Феномен макротиропинемии в современной клинической практике // Клиническая и экспериментальная тиреоидология, 2012. Т. 8, № 4. С. 25-26. [Sorokin M.Yu., Macrotyropinemia in clinical practice. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya tireoidologiya = Clinical and Experimental Thyroidology*, 2012, Vol. 8, no. 4, pp. 25-26. (In Russ.)]
3. Balazs C., Racz K. Diagnostic and therapeutical significance of macro-TSH in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Orv. Hetil.*, 2017, Vol. 158, no. 34, pp. 1346-1350.
4. Biondi B., Cooper D.S. The clinical significance of subclinical thyroid dysfunction. *Endocr. Rev.*, 2008, Vol. 29, no. 1, pp. 76-131.
5. Halsall D.J., Fahie-Wilson M.N., Hall S.K., Barker P., Anderson J., Gama R., Chatterjee V.K. Macro thyrotropin-IgG complex causes factitious increases in thyroid stimulating hormone screening tests in a neonate and mother. *Clin. Chem.*, 2006, Vol. 52, no. 10, pp. 1969-1970.
6. Hattori N., Ishihara T., Saiki Y. Macroprolactinaemia: prevalence and aetiologies in a large group of hospital workers. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2009, Vol. 71, no. 5, pp. 702-708.
7. Hattori N., Ishihara T., Yamagami K., Shimatsu A. Macro TSH in patients with subclinical hypothyroidism. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2015, Vol. 83, no. 6, pp. 923-930.
8. Hattori N., Ishihara T., Shimatsu A. Variability in the detection of macro TSH in different immunoassay systems. *Eur. J. Endocrinol.*, 2016, Vol. 174, no. 1, pp. 9-15.
9. Hattori N., Ishihara T., Matsuoka N., Saito T., Shimatsu A. Anti-thyrotropin autoantibodies in patients with macro-thyrotropin and long-term changes in macro-thyrotropin and serum thyrotropin levels. *Thyroid*, 2017, Vol. 27, no. 2, pp. 138-146.
10. Hattori N., Aisaka K., Chihara K., Shimatsu A. Current thyrotropin immunoassays recognize macro-thyrotropin leading to hyperthyrotropinemia in females of reproductive age. *Thyroid*, 2018, Vol. 28, no. 10, pp. 1252-1260.
11. Ismail A.A., Walker P.L., Barth J.H., Lewandowski K.C., Jones R., Burr W.A. Wrong biochemistry results: two case reports and observational study in 5310 patients on potentially misleading thyroid stimulating hormone and gonadotropin immunoassay results. *Clin. Chem.*, 2002, Vol. 48, no. 11, pp. 2023-2029.
12. Keffer J.H. Preanalytical considerations in testing thyroid function. *Clin. Chem.*, 1996, Vol. 42, no. 1, pp. 125-134.
13. Leslie H., Courtney C.H., Bell P.M., Hadden D.R., McCance D.R., Ellis P.K., Sheridan B., Atkinson A.B. Laboratory and clinical experience in 55 patients with macroprolactinemia identified by a simple polyethylene glycol precipitation method. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, Vol. 86, no. 6, pp. 2743-2746.
14. Loh T.P., Kao S.L., Halsall D.J., Toh S.A., Chan E., Ho S.C., Tai E.S., Khoo C.M. Macro-thyrotropin: a case report and review of literature. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 2012, Vol. 97, no. 6, pp. 1823-1827.
15. Mills F., Jeffery J., Mackenzie P., Cranfield A., Ayling R.M. An immunoglobulin G complexed form of thyroid-stimulating hormone (macro thyroid-stimulating hormone) is a cause of elevated serum thyroid-stimulating hormone concentration. *Ann. Clin. Biochem.*, 2013, Vol. 50, no. 5, pp. 416-420.
16. Sakai H., Fukuda G., Suzuki N., Watanabe C., Odawara M. Falsely elevated thyroid-stimulating hormone (TSH) level due to macro-TSH. *Endocr. J.*, 2009, Vol. 56, no. 3, pp. 435-440.
17. Shapira Y., Agmon-Levin N., Shoenfeld Y. Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. *J. Autoimmun.*, 2010, Vol. 34, no. 3, pp. 168-177.

Авторы:

Биктагирова Э.М. — к.б.н., старший научный сотрудник кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Вагапова Г.Р. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой эндокринологии ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Семаков Г.П. — аспирант кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Золотоверхова Н.И. — аспирант кафедры эндокринологии ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Невзорова Т.А. — к.б.н., доцент, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Андреанова И.А. — младший научный сотрудник кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Евтюгина Н.Г. — бакалавр кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Акберова Н.И. — к.б.н., старший научный сотрудник, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Хисамутдинов А.Н. — к.м.н., доцент, доцент кафедры общественного здоровья и организации здравоохранения ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Абрамова З.И. — д.б.н., профессор, профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Authors:

Biktagirova E.M., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Vagapova G.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Endocrinology, Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Semakov G.P., Postgraduate Student, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Zolotoverkchova N.I., Postgraduate Student, Department of Endocrinology, Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Nevzorova T.A., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Andrianova I.A., Junior Research Associate, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Evtugina N.G., Bachelor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Akberova N.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Associate Professor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Khislamutdinov A.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Public Health and Healthcare Management, Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abramova Z.I., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Поступила 11.06.2019

Отправлена на доработку 19.06.2019

Принята к печати 16.09.2019

Received 11.06.2019

Revision received 19.06.2019

Accepted 16.09.2019

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ В1- И В2-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ СЕРОНЕГАТИВНОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ СУСТАВНОЙ ФОРМЫ

Сизякина Л.П., Харитонова М.В.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Иммунопатогенез ревматоидного артрита (РА) характеризуется поликлональной активацией В-лимфоцитов, изменением их субпопуляционного состава, нарушением периферической толерантности, усилением активации и дифференцировки В-клеток, а также дефектом негативной селекции. Были изучены методом проточной цитометрии фенотипы В1- и В2-лимфоцитов периферической крови, их соотношение и закономерности реагирования при серонегативном варианте РА суставной формы в период реактивации заболевания, а также в зависимости от давности и степени активности.

Выявлено снижение В1-лимфоцитов с увеличением степени активности и давности течения РА. Преобладающей субпопуляцией в периферической крови оставались В2-лимфоциты. Изучаемые параметры В2-лимфоцитов при стаже заболевания до 5 лет и более были выше данных контрольной группы, однако при их сопоставительном анализе достоверных изменений в их динамике не выявлено. С увеличением степени активности снижается активационный потенциал В2-лимфоцитов и процессы передачи костимулирующего сигнала через комплекс CD40/CD40L.

Определение В1- и В2-лимфоцитов при различных вариантах РА могут быть использованы в качестве диагностических и прогностических маркеров.

Ключевые слова: серонегативный ревматоидный артрит, В1-, В2-лимфоциты, костимулирующие молекулы, проточная цитометрия

DYNAMICS OF CHANGES IN B1 AND B2 LYMPHOCYTE POPULATIONS IN ARTICULAR FORM OF SERONEGATIVE RHEUMATOID ARTHRITIS

Sizyakina L.P., Kharitonova M.V.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) is characterized by polyclonal activation of B lymphocytes, changes in their subpopulation composition, impaired peripheral tolerance, increased activation and differentiation of B cells, as well as deficient negative selection. Peripheral blood phenotypes of B1 and B2 lymphocytes, their correlation and response patterns in seronegative variant of articular RA type

Адрес для переписки:

Харитонова Мария Владимировна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону,
пер. Нахичеванский, 29.
Тел.: 8 (863) 263-44-41.
E-mail: mari.kharitonova.80@mail.ru

Address for correspondence:

Kharitonova Maria V.
Rostov State Medical University
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don,
Nakhichevansky lane, 29.
Phone: 7 (863) 263-44-41.
E-mail: mari.kharitonova.80@mail.ru

Образец цитирования:

Л.П. Сизякина, М.В. Харитонова «Динамика изменений В1- и В2-лимфоцитов при серонегативном ревматоидном артрите суставной формы» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1073-1080.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1073-1080
© Сизякина Л.П., Харитонова М.В., 2019

For citation:

L.P. Sizyakina, M.V. Kharitonova "Dynamics of changes in B1 and B2 lymphocyte populations in articular form of seronegative rheumatoid arthritis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1073-1080.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1073-1080
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1073-1080

during the disease reactivation, as well as dependence on the age and degree of activity were studied by flow cytometry.

A decrease in B1 lymphocytes along with increased degree of clinical activity and duration of RA has been revealed. B2 lymphocytes remained the predominant subpopulation in peripheral blood. The studied parameters of B2 lymphocytes in the patients with disease duration of up to 5 years and more were higher than the data obtained in a control group. However, no significant changes in their dynamics were revealed upon comparative analysis. With increasing degree of clinical activity, the decreased activation potential of B2 lymphocytes was revealed, along with reduction of costimulatory signal transmission via the CD40/CD40L complex. Hence, detection of B1 and B2 lymphocytes in various types of RA may be used as diagnostic and prognostic markers.

Keywords: *seronegative rheumatoid arthritis, B1 cells, B2 cells, co-stimulating molecules, flow cytometry*

Введение

В настоящее время наблюдается широкое распространение и неуклонный рост числа заболеваний, в возникновении и прогрессировании которых нарушения иммунной системы играют основную патогенетическую роль. Одним из представителей данных заболеваний является ревматоидный артрит (РА) [5, 8, 12].

Иммунопатогенез ревматоидного артрита (РА) сложен и многогранен, затрагивает все звенья иммунной системы, и в частности В-лимфоциты. В-клетки являются не только продуцентами провоспалительных цитокинов, аутоантител (ревматоидный фактор, антитела к циклическому цитруллинированному пептиду, антитела к модифицированному виментину и др.), но и презентируют антигены Т-лимфоцитам, влияют на их активацию посредством корцепторных молекул [3, 7, 9, 11, 15, 17, 18, 19, 20, 21].

В настоящее время широко исследуется роль при ревматических аутоиммунных заболеваниях субпопуляций В-лимфоцитов, таких как наивные В-клетки, плазмобласты, В-клетки памяти, при этом полученные данные различны и противоречивы [2, 10, 12, 16, 20, 21].

Несмотря на достигнутые успехи в научном и клиническом изучении РА, многие вопросы остаются открытыми. В частности, практически отсутствуют данные о соотношении В1- и В2-лимфоцитов, закономерности их работы у пациентов с серонегативным вариантом течения РА суставной формы в период активации заболевания, степени активности и давности течения.

Целью работы является изучение соотношения В1- и В2-лимфоцитов и особенности их фенотипов у пациентов с серонегативным вариантом РА суставной формы в период реактивации заболевания, а также в зависимости от длительности течения и степени активности РА.

Материалы и методы

В рамках выполненной работы обследован 41 пациент с серонегативным РА суставной формы: 36 женщин (87,8%) и 5 мужчин (12,2%). Средний возраст обследуемых составил 50 ± 20 лет, при этом лиц до 50 лет — 12 человек (29,27%), старше

50 — 29 (70,73%). В зависимости от давности течения заболевания обследуемые распределились следующим образом: до 5 лет — 20 (48,78%) пациентов, более 5 лет — 21 (51,22%). В зависимости от прогрессии аутоиммунного процесса пациенты были разделены: со II степенью активности — 20 пациентов (48,78%), с III — 21 (51,22%).

Пациенты находились на стационарном лечении в терапевтическом отделении № 2 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, ревматологическом отделении ГБУ ОКБ № 2 г. Ростова-на-Дону. Иммунологические исследования проводились на базе НУПК «Клиническая иммунология». В качестве контрольной группы были обследованы 20 практически здоровых доноров крови. Диагноз устанавливался на основании диагностических критериев, разработанных в 2010 г. Американской коллегией ревматологов (American College of Rheumatology — ACR) и Европейской антиревматической лигой (European League Against Rheumatism — EULAR) [4].

Для изучения иммунофенотипа В-лимфоцитов, а также процессов их межклеточного взаимодействия с Т-лимфоцитами был использован комплекс иммунологических методов исследования.

Изучение субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови проводили с помощью проточной цитофлуориметрии по экспрессии мембранных и внутриклеточных антигенов, с учетом результатов на проточном лазерном цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter, США) [1, 13, 15].

Выделяли следующие субпопуляции В-клеток:

В1-лимфоциты ($CD19^+CD5^+CD45^+$), зрелые В2-лимфоциты ($CD19^+CD5^+CD45^+$), наивные В2-клетки ($CD19^+CD45RA^+CD27^+CD45^+$), В2-клетки памяти ($CD19^+CD45RA^+CD27^+CD45^+$), маркеры презентации антигена ($CD19^+HLA-DR^+CD45^+$), маркеры ранней активации ($CD19^+CD23^+CD45^+$, $CD19^+CD25^+CD45^+$), костимулирующие молекулы ($CD19^+CD40^+CD45^+$, $CD19^+CD86^+CD45^+$), готовность В-лимфоцитов к апоптозу ($CD19^+CD95^+CD45^+$), маркеры апоптоза В-клеток ($CD19^+Ap^+CD45^+$), а также лиганд для взаимодействия Т-лимфоцитов с В-клетками ($CD3^+CD4^+CD40L^+CD45^+$).

Функциональную активность В-лимфоцитов оценивали по количественному содержанию сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G с использованием метода радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини. Антигенсвязывающую функцию сывороточных иммуноглобулинов оценивали по количеству циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) методом преципитации в полиэтиленгликоле 6000.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием статистического пакета Statistica 6.2 (StatSoft Inc., США) и электронных таблиц Excel 2007. Достоверность различий в группах оценивалась с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Вилкоксона. Достоверными считались результаты при $p \leq 0,05$.

Результаты

Анализ содержания в периферической крови В1-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD19⁺CD5⁺ у пациентов с серонегативным РА суставной формы в стадию обострения выявил их почти четырехкратный рост по отношению к контрольной группе ($p < 0,001$) (табл. 1). При этом также выявлено, что В2-лимфоциты, негативные по экспрессии мембранного антигена CD5⁺, увеличены по отношению к референтным данным в 1,5 раза (табл. 1). Распределение субпопуляций В1- и В2-лимфоцитов к общей популяции В-клеток периферической крови составило: В1 — 7,6%, а В2 — 92,4% соответственно. Таким образом, несмотря на значительное увеличение содержания В1-лимфоцитов, все же преобладающей субпопуляцией в периферической крови являются В2-лимфоциты. Учитывая полученные данные, представляло интерес проанализировать фенотип В2-лимфоцитов по экспрессии мембранных и внутриклеточных маркеров, характеризующих

презентацию антигена, процессы межклеточной кооперации, активацию, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз.

Активационный потенциал В2-лимфоцитов у пациентов с серонегативным РА суставной формы в период реактивации проявлялся увеличением экспрессии мембранных маркеров ранней активации CD25⁺, CD23⁺ по сравнению с группой контроля. Процесс пролиферации и дифференцировки В2-лимфоцитов характеризовался увеличением количества наивных CD3⁺CD19⁺CD27⁺ и зрелых клеток CD3⁺CD19⁺CD5⁺ по отношению к группе контроля и отсутствием статистически значимых изменений в количестве клеток иммунологической памяти CD19⁺CD45RA⁺CD27⁺ (табл. 1). Уровень В2-лимфоцитов с фенотипом CD19⁺CD95⁺, готовых к восприятию апоптотического сигнала, и клеток, ушедших в апоптоз (CD19⁺An⁺), документируется выше контрольных значений (табл. 1). Процесс презентации антигена и межклеточная кооперация В- и Т-лимфоцитов проявлялся в увеличении экспрессии мембранной молекулы HLA-DR, костимуляторных молекул CD40, CD86 на В2-лимфоцитах (табл. 1), а также CD40L-лиганда ($0,73 \pm 0,16\%$ и $0,3 \pm 0,005\%$) на Т-хелперах, обеспечивающих взаимодействие с CD40-молекулой по сравнению с группой контроля.

Анализ гуморальных компонентов иммунного ответа показал, что суммарная интеграция работы В1- и В2-клеток привела к повышению синтеза сывороточных иммуноглобулинов классов IgA ($2,24 \pm 0,1$ и $1,42 \pm 0,05$ г/л), IgM ($1,41 \pm 0,06$ и $1,10 \pm 0,02$ г/л), IgG ($11,4 \pm 0,24$ и $10,2 \pm 0,22$ г/л), а также ЦИК ($98,8 \pm 8,04$ и $63,9 \pm 0,6$ у. е.) по отношению к группе контроля.

Таким образом, в стадию активности патологического процесса мы выявили существенные изменения функциональных потенциалов различных фенотипов В-лимфоцитов. Однако, учи-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ В-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ СЕРОНЕГАТИВНОМ ВАРИАНТЕ СУСТАВНОЙ ФОРМЫ РА (M±m)

TABLE 1. PARAMETERS OF B LYMPHOCYTES UNDER THE SERONEGATIVE VARIANT OF THE ARTICULAR FORM RA (M±m)

Показатели Indicators	Серонегативный вариант суставной формы РА Seronegative variant of articular form of RA	Контроль Control group
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD45 ⁺ , %	$0,90 \pm 0,20^*$	$0,19 \pm 0,03$
CD19 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺ , %	$8,90 \pm 0,74^*$	$5,65 \pm 0,46$
CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD45 ⁺ , %	$11,80 \pm 0,71^*$	$7,93 \pm 0,45$
CD19 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺ , %	$2,67 \pm 0,33$	$2,27 \pm 0,34$
CD19 ⁺ CD23 ⁺ CD45 ⁺ , %	$3,35 \pm 0,46^*$	$0,90 \pm 0,14$
CD19 ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺ , %	$0,35 \pm 0,04^*$	$0,050 \pm 0,013$
CD19 ⁺ CD95 ⁺ CD45 ⁺ , %	$1,20 \pm 0,20^*$	$0,33 \pm 0,03$
CD19 ⁺ An ⁺ CD45 ⁺ , %	$1,55 \pm 0,13^*$	$0,50 \pm 0,03$
CD19 ⁺ CD40 ⁺ CD45 ⁺ , %	$10,10 \pm 0,72^*$	$7,02 \pm 0,42$
CD19 ⁺ CD86 ⁺ CD45 ⁺ , %	$0,90 \pm 0,10^*$	$0,13 \pm 0,01$
CD19 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺ , %	$10,10 \pm 0,75^*$	$7,4 \pm 0,4$

Примечание. Отмечены статистически достоверные различия между контрольной группой при * $p < 0,05$.

Note. There were statistically significant differences between the control group at * $p < 0.05$.

тывая, что РА — хронический воспалительный процесс, протекающий годами, определенный интерес представлял анализ функциональных свойств фенотипов В-лимфоцитов в стадии реактивации в зависимости от длительности течения патологического процесса.

Количественный анализ общего пула В-лимфоцитов у пациентов при длительности течения заболевания до 5 лет показал статистически значимое увеличение количества как В1-лимфоцитов ($1,40 \pm 0,49$ и $0,19 \pm 0,03\%$), так и В2-клеток ($13,0 \pm 1,09$ и $7,93 \pm 0,45\%$) по отношению к контролю. При этом их процентное соотношение к общей популяции В-лимфоцитов периферической крови составило: В1-лимфоцитов — 10,8%, а В2 — 89,2% соответственно. При стаже заболевания более 5 лет выявлено увеличение В1-лимфоцитов в 3 раза ($0,6 \pm 0,11$ и $0,19 \pm 0,03\%$), а В2-лимфоцитов — в 1,4 раза ($11,1 \pm 0,91$ и $7,93 \pm 0,45\%$) по отношению к группе контроля. Соотношение В1- и В2-лимфоцитов составило 5,4 и 94,6% соответственно. Однако сопоставительный анализ в зависимости от длительности течения РА показал, что с увеличением стажа заболевания более 5 лет наблюдается статистически значимое снижение количества В1-лимфоцитов почти в 4 раза, при этом количество В2-лимфоцитов не зависит от длительности течения РА (табл. 2).

Увеличение количества наивных и зрелых В2-лимфоцитов определяется вне зависимости от длительности течения заболевания. Содер-

жание В-клеток памяти при стаже заболевания как до 5 лет, так и более находилось в пределах референтных значений (табл. 2).

Способность воспринимать активационный потенциал В2-лимфоцитов проявлялась в увеличении экспрессии мембранных молекул CD23, CD25 выше контрольных значений при длительности заболевания до 5 лет и более, однако сопоставительный анализ статистически значимых различий не выявил (табл. 2).

При течении РА до 5 лет и более процесс апоптоза В2-лимфоцитов характеризовался увеличением экспрессии мембранного антигена CD95⁺ и внутриклеточного рецептора к аннексину (An) по отношению к данным контрольной группы (табл. 2).

Уровень В2-лимфоцитов с фенотипом CD19⁺HLA-DR⁺, CD19⁺CD40⁺CD19⁺CD86⁺, а также CD40L на активированных CD4-лимфоцитах при стаже заболевания до 5 лет и более оказался достоверно выше по сравнению с контролем (табл. 2).

Сравнительный анализ маркеров межклеточного взаимодействия Т- и В-лимфоцитов выявил снижение готовности Т-хелперов к межклеточной кооперации, что документируется тенденцией к снижению на них экспрессии CD40L к молекуле при длительности заболевания более 5 лет, однако экспрессия на В2-лимфоцитах костимулирующей молекулы CD40 не зависела от давности заболевания (табл. 2). При этом костимулирующая молекула CD86 имеет тенденцию

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ В-ЛИМФОЦИТОВ СЕРОНЕГАТИВНОГО ВАРИАНТА СУСТАВНОЙ ФОРМЫ РА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ТЕЧЕНИЯ ($M \pm m$)

TABLE 2. PARAMETERS OF B LYMPHOCYTES OF THE SERONEGATIVE VARIANT OF THE ARTICULAR FORM RA DEPENDING ON THE DURATION OF THE DISEASE ($M \pm m$)

Показатели Indicators	Длительность заболевания до 5 лет Duration of disease up to 5 years	Длительность заболевания более 5 лет Duration of disease more than 5 years	Контроль Control group
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD45 ⁺ , %	$1,40 \pm 0,49^*$	$0,60 \pm 0,11^{**}$	$0,19 \pm 0,03$
CD19 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺ , %	$10,20 \pm 0,85^*$	$8,12 \pm 1,05^*$	$5,65 \pm 0,46$
CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD45 ⁺ , %	$13,00 \pm 1,09^*$	$11,10 \pm 0,91^*$	$7,93 \pm 0,45$
CD19 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺ , %	$2,98 \pm 0,52$	$2,47 \pm 0,42$	$2,27 \pm 0,34$
CD19 ⁺ CD23 ⁺ CD45 ⁺ , %	$3,74 \pm 0,76^*$	$3,12 \pm 0,60^*$	$0,90 \pm 0,14$
CD19 ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺ , %	$0,36 \pm 0,06^*$	$0,35 \pm 0,05^*$	$0,050 \pm 0,013$
CD19 ⁺ CD95 ⁺ CD45 ⁺ , %	$1,00 \pm 0,31^*$	$1,33 \pm 0,26^*$	$0,33 \pm 0,03$
CD19 ⁺ An ⁺ CD45 ⁺ , %	$1,55 \pm 0,19^*$	$1,55 \pm 0,18^*$	$0,50 \pm 0,03$
CD19 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺ , %	$12,00 \pm 1,01^*$	$9,30 \pm 1,00^*$	$7,4 \pm 0,4$
CD19 ⁺ CD40 ⁺ CD45 ⁺ , %	$11,50 \pm 1,17^*$	$9,24 \pm 0,90^*$	$7,02 \pm 0,42$
CD19 ⁺ CD86 ⁺ CD45 ⁺ , %	$0,764 \pm 0,090^*$	$1,0 \pm 0,2^*$	$0,13 \pm 0,01$
CD4 ⁺ CD40L ⁺ CD45 ⁺ , %	$1,00 \pm 0,39$	$0,60 \pm 0,12$	$0,300 \pm 0,005$

Примечание. Отмечены статистически достоверные различия между контрольной группой при * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$ — отмечены статистически достоверные различия между длительностью течения РА.

Note. There were statistically significant differences between the control group at * $p < 0.05$; ** $p < 0.05$, statistically significant differences between the duration of the course of RA.

к увеличению экспрессии на В2-клетках, компенсаторно усиливая сигнал от пары CD40/CD40L на Т-хелперы с последующей их активацией при длительности течения РА более 5 лет. Антигенпредставляющая функция В-лимфоцитов имела тенденцию к снижению при длительности заболевания более 5 лет (табл. 2).

Для более детального анализа наличия взаимосвязи между изменением фенотипа В2-лимфоцитов и длительностью течения РА был проведен корреляционный анализ, который выявил, что с увеличением длительности заболевания более 5 лет наблюдается умеренная отрицательная связь с экспрессией корцепторной молекулы CD40⁺ ($r = -0,44$; $p = 0,02$) на В2-клетках, количеством наивных В-клеток ($r = -0,49$; $p = 0,007$), а также антигенпредставляющей функцией В2-лимфоцитов ($r = -0,42$; $p = 0,022$).

Течение РА до 5 лет и более сопровождалось достоверным увеличением количества содержания сывороточных иммуноглобулинов классов IgA (до 5 лет — $2,39 \pm 0,13$ г/л, более 5 лет — $2,14 \pm 0,12$ г/л, контроль — $1,42 \pm 0,05$ г/л), IgM (до 5 лет — $1,52 \pm 0,07$ г/л, более 5 лет — $1,34 \pm 0,07$ г/л, контроль — $1,10 \pm 0,02$ г/л) IgG (до 5 лет — $11,4 \pm 0,4$ г/л, более 5 лет — $11,4 \pm 0,33$ г/л, контроль — $10,2 \pm 0,22$ г/л) и ЦИК (до 5 лет — $101 \pm 12,5$ у. е., более 5 лет — $97,7 \pm 10,7$ у. е., контроль — $63,9 \pm 0,57$ у. е.) по отношению к контрольной группе.

Сопоставительный анализ суммарной работы В1- и В2-лимфоцитов выявил тенденцию к снижению содержания иммуноглобулина класса IgA ($2,39 \pm 0,13$ г/л и $2,14 \pm 0,12$ г/л) при манифестации

заболевания более 5 лет, тогда как иммуноглобулины классов IgM, IgG и ЦИК статистически значимо не различались, вне зависимости от длительности течения серонегативного РА суставной формы.

Отмеченные особенности, связанные давностью заболевания, послужили основанием для дальнейшего поиска и выявления различий в реакциях В-звена иммунной системы в зависимости от степени активности ревматоидного артрита.

Так, при II степени активности РА выявлено увеличение в 5,8 раза количества В1-лимфоцитов и в 1,3 раза В2-лимфоцитов по отношению к контрольной группе (табл. 3). Их соотношение к общему пулу В-клеток составило: В1 — 10,4%, а В2 — 89,6% соответственно. В1-лимфоциты при III степени активности характеризовались увеличением в 2,6 раза, а В2-клетки — в 1,8 раза по отношению к данным контрольной группы (табл. 3). Соотношение субпопуляций В1- и В2-лимфоцитов составило 3,6 и 96,4% соответственно. Сопоставительный анализ в зависимости от степени активности патологического процесса показал, что количество В1-лимфоцитов достоверно снижается от II степени активности к III ($1,1 \pm 0,33$ и $0,5 \pm 0,1$ %) практически в 3,2 раза, а количество В2-лимфоцитов увеличивается ($10,6 \pm 1,0$ и $14,0 \pm 0,9$ %) в 1,3 раза.

Количество наивных В-клеток с фенотипом CD19⁺CD27⁻ и зрелых В2-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺) при II и III степени активности было выше референтных значений (табл. 3). Количество В-клеток памяти с фенотипом CD19⁺CD27⁺ при II степени активности было

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ В-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ АКТИВНОСТИ СЕРОНЕГАТИВНОГО ВАРИАНТА СУСТАВНОЙ ФОРМЫ РА (M±m)

TABLE 3. PARAMETERS OF B LYMPHOCYTES WITH DIFFERENT DEGREES OF ACTIVITY OF THE SERONEGATIVE VARIANT OF ARTICULAR FORM RA (M±m)

Показатели Indicators	II степень активности II degree of activity	III степень активности III degree of activity	Контроль Control group
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD45 ⁺ , %	1,10±0,33*	0,5±0,1**	0,19±0,03
CD19 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁻ CD45 ⁺ , %	8,13±0,81*	10,60±1,12*	5,65±0,46
CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD45 ⁺ , %	10,6±1,0*	14,0±0,9**	7,93±0,45
CD19 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺ , %	2,16±0,30	3,56±0,90*	2,27±0,34
CD19 ⁺ CD23 ⁺ CD45 ⁺ , %	3,61±0,66*	2,89±0,78*	0,90±0,14
CD19 ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺ , %	0,40±0,08*	0,21±0,03**	0,050±0,013
CD19 ⁺ CD95 ⁺ CD45 ⁺ , %	1,20±0,30*	1,20±0,33*	0,33±0,03
CD19 ⁺ An ⁺ CD45 ⁺ , %	1,55±0,15*	1,30±0,10*	0,50±0,03
CD19 ⁺ CD40 ⁺ CD45 ⁺ , %	9,31±1,00*	11,70±1,67*	7,02±0,42
CD19 ⁺ CD86 ⁺ CD45 ⁺ , %	0,95±0,16*	0,90±0,09*	0,13±0,01
CD19 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺ , %	9,11±1,45*	11,40±1,49*	7,4±0,4

Примечание. Отмечены статистически достоверные различия между контрольной группой при * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$ — отмечены статистически достоверные различия между II и III степенью активности.

Note. There were statistically significant differences between the control group at * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$, statistically significant differences between II and III degree of activity.

в пределах референтных значений, однако при III степени активности отмечен их рост по отношению к группе контроля. Сопоставительный анализ в зависимости от степени активности выявил увеличение количества зрелых В2-лимфоцитов от средней к высокой степени активности, тогда как наивные и В-клетки памяти достоверно не изменялись от клинической манифестации РА (табл. 3).

Экспрессия маркера ранней активации CD23 статистически значимо не изменялась от II к III степени активности, но была выше данных контрольной группы (табл. 3). Рецептор к интерлейкину-2 (CD25) характеризовался достоверным снижением от II к III степени активности на В2-лимфоцитах (табл. 3).

Сохранение баланса между активированными и пролиферирующими В-клетками обеспечивается с помощью процесса апоптоза. Так, у пациентов со средней и высокой степенью активности выявлено увеличение экспрессии мембранного маркера готовности к апоптозу CD95 и количества апоптозирующих В2-лимфоцитов в реакции с аннексином по отношению к группе контроля (табл. 3). Однако сопоставительный анализ данных маркеров с ростом степени активности патологического процесса не выявил достоверных различий в их экспрессии (табл. 3).

Изучение экспрессии костимулирующих молекул и их влияния на процессы межклеточного контакта В- и Т-лимфоцитов выявило увеличение экспрессии молекулы CD40 на В2-лимфоцитах с одновременным увеличением экспрессии лиганда CD40L на Т-хелперах как при средней, так и при высокой степени активности РА по отношению к группе контроля (табл. 3). Сигналом к индукции или усилению экспрессии костимулирующей молекулы CD86 служит взаимодействие пары молекул CD40 и CD40L. Активационный сигнал, возникающий при их взаимодействии, носит двунаправленный характер, активирует как В-, так и Т-лимфоциты, а также повышает экспрессию молекул, участвующих в презентации антигена [17]. Данный факт в работе иллюстрируется статистически значимым увеличением экспрессии молекулы CD86 и HLA-DR на В2-лимфоцитах при II и III степени активности по отношению к контролю (табл. 3).

При сравнительном анализе процессов контактного взаимодействия Т- и В-лимфоцитов выявлено отсутствие значимых изменений в экспрессии костимулирующих молекул CD86, CD40 и мембранного антигена HLA-DR на В2-клетках от II степени активности к III. При этом наблюдается статистически значимое снижение относительного количества активированных Т-хелперов, экспрессирующих CD40L к молекуле CD40 на В2-лимфоцитах по мере роста степени активности патологического процесса ($0,90 \pm 0,3$ и $0,33 \pm 0,08\%$).

При анализе эффекторной фазы гуморального иммунного ответа при II и III степени активности выявлено статистически значимое увеличение содержания иммуноглобулинов классов IgA, IgM и ЦИК по отношению к контролю. Количественное содержание иммуноглобулина класса Ig G при II степени активности находилось в пределах референтных значений ($11,4 \pm 0,3$ и $10,2 \pm 0,22$ г/л), однако при III степени активности наблюдается увеличение по отношению к группе контроля ($11,8 \pm 0,6$ и $10,2 \pm 0,22$ г/л).

При сопоставительном анализе функциональной активности В-лимфоцитов не выявлено достоверных различий в содержании иммуноглобулинов классов IgA, IgM, IgG и ЦИК от II к III степени активности.

Обсуждение

В зависимости от наличия мембранного CD5-антигена все В-лимфоциты подразделяются на две субпопуляции: CD5⁺ (В1-клетки) и CD5⁻ (В2-клетки) [3, 6, 10, 14].

В1-лимфоциты являются самовозобновляющимися долгоживущими клетками. Играют важную роль в осуществлении первой линии защиты от инкапсулированных бактерий, принимают участие в формировании мукозального иммунитета, обеспечивают защиту слизистых оболочек респираторного и пищеварительного тракта. В1-лимфоциты не формируют клеток памяти. Помимо защитной роли, В1-лимфоциты могут быть причиной развития лимфопролиферативной и аутоиммунной патологии, так как данные клетки потенциально аутореактивны и могут перекрестно реагировать со многими сходными антигенными детерминантами [15].

В2-лимфоциты являются основной популяцией В-клеток, циркулирующих в периферической крови. Являются эффекторными клетками, принимающими участие в развитии и поддержании адаптивного иммунитета и аутоиммунных нарушений. Обладают свойствами иммунорегуляторных клеток, способны презентировать антигены Т-лимфоцитам, индуцировать активацию Т-клеток, синтезировать провоспалительные цитокины (TNF, IL-6, IL-1 β) [15].

Таким образом, процесс анализа субпопуляций В1- и В2-лимфоцитов показал, что количество В1-лимфоцитов снижается с увеличением длительности течения и степени активности серонегативного РА суставной формы, но все же данная субпопуляция остается выше данных контрольной группы. При этом доминирующей популяцией являются В2-лимфоциты.

Анализ экспрессии мембранных и внутриклеточных маркеров В2-клеток, вне зависимости от длительности течения РА, выявил однонаправленность реакций иммунной системы, а именно усиление презентации антигена, активации, апоптоза и процессов межклеточной

кооперации. При этом корреляционный анализ показывает, что чем больше стаж РА, тем меньше способность В2-лимфоцитов представлять антиген, взаимодействовать с Т-лимфоцитами и активировать не только их, но активироваться самим от двунаправленного костимулирующего сигнала, возникающего при взаимодействии костимулирующей молекулы CD40⁺ и соответствующего лиганда CD40L на Т-хелперах, а также снижении количества наивных В2-клеток.

Увеличение степени активности РА сопровождается снижением активационного потенциала В2-лимфоцитов за счет экспрессии рецептора к интерлейкину-2 (CD25), обеспечивающему поддержание пролиферации и выживания активированных антигеном В-клеток.

Процесс межклеточной кооперации сопровождается нарушением передачи активационного сигнала через комплекс CD40\CD40L, что приводило к анергии Т-хелперов и иллюстрировалось количественным их снижением. Ко-

стимуляторное взаимодействие CD40\CD40L служит мощным индуктором для пролиферации В-лимфоцитов, которая существенно усиливается под действием CD25. Из полученных данных следует, что при серонегативном РА суставной формы с увеличением степени активности происходит снижение экспрессии CD25, CD40L и снижение эффекторной функции В2-лимфоцитов, проявляющейся в отсутствии достоверного нарастания иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG в сыворотке крови.

Таким образом, выявленные изменения в иммунной системе у пациентов с серонегативным РА суставной формы свидетельствуют о важной роли В-лимфоцитов и процессов межклеточной кооперации в прогнозе течения заболевания. Становится очевидным, что по мере развития знаний о взаимосвязях и отличительных признаках фенотипов В-лимфоцитов при различных вариантах течения РА появятся новые биомаркеры в диагностике и прогнозе.

Список литературы / References

1. Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Хайдуков С.В. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A., Khaydukov S.V. Standardized technology "Peripheral blood lymphocyte subpopulations by using of flow cytometry-analizators" (project). *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.
2. Будкова А.И., Лапин С.В., Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Тришина И.Н., Маслянский А.Л., Тотолян Арег А. Субпопуляционный состав В-клеток периферической крови у больных системной красной волчанкой // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 175-184. [Budkova A.I., Lapin S.V., Serebryakova M.K., Kudryavtsev I.V., Trishina I.N., Maslyansky A.L., Totolyan Areg A. Subpopulation composition of peripheral blood B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 175-184. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184.
3. Дьяков И.Н., Сидорова Е.В. Субпопуляции В-лимфоцитов и влияние микроокружения на их функциональную активность // Пульмонология, 2010. № 5. С. 116-123. [Dyakov I.N., Sidorova E.V. Subpopulations of B lymphocytes and the effect of the microenvironment on their functional activity. *Pulmonologiya = Pulmonology*, 2010, no. 5, pp. 116-123. (In Russ.)]
4. Каратеев Д.Е., Олюнин Ю.А., Лучихина Е.Л. Новые классификационные критерии ревматоидного артрита ACR/EULAR 2010 шаг вперед к ранней диагностике // Научно-практическая ревматология, 2011. Т. 49, № 1. С. 10-15. [Karateev D.E., Olyunin Yu.A., Luchikhina E.L. New classification criteria for rheumatoid arthritis ACR/EULAR 2010 a step forward to early diagnosis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2011, Vol. 49, no. 1, pp. 10-15. (In Russ.)]
5. Козлов В.А. Клетки-супрессоры – основа иммунопатогенеза аутоиммунных заболеваний // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 7-14. [Kozlov V.A. Suppressor cells are the basis of the immunopathogenesis of autoimmune diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 1, pp. 7-14. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-7-14.
6. Кудрявцев И. В., Ильвес А.Г., Кробинец И. И., Минеев К. К., Серебрякова М.К., Петров А.М., Столярков И.Д. Изменения в субпопуляционном составе В-лимфоцитов периферической крови при рассеянном склерозе // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 2. С. 150-154. [Kudryavtsev I.V., Ilves A.G., Krobinec I. I., Mineev K.K., Serebryakova M.K., Petrov A.M., Stolyarov I.D. Changes in the subpopulation composition of peripheral blood B lymphocytes in multiple sclerosis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 2, pp. 150-154. (In Russ.)]
7. Лазарева Н.М., Лапин С.В., Мазинг А.В., Булгакова Т.В., Иливанова Е.П., Маслянский А.Л., Тотолян А.А. Оптимизация комплекса серологических методов диагностики системных заболеваний соединительной ткани // Клиническая лабораторная диагностика, 2011. № 12. С. 12-17. [Lazareva N.M., Lapin S.V., Mazing A.V., Bulgakova T.V., Ilivanova E.P., Maslyansky A.L., Totolian A.A. Optimization of serological diagnostic methods of connective tissue diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2011, no. 12, pp. 12-17. (In Russ.)]
8. Насонов Е.Л. Ингибция иммунных контрольных точек и аутоиммунитет: ревматологические проблемы // Научно-практическая ревматология, 2018. Т. 56, № 1. С. 5-9. [Nasonov E.L. Inhibition of immune control points and autoimmunity: rheumatological problems. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2018, Vol. 56, no. 1, pp. 5-9. (In Russ.)]

9. Насонов Е.Л. Проблемы иммунопатологии ревматоидного артрита: эволюция болезни // Научно-практическая ревматология, 2017. Т. 55, № 3. С. 277-294. [Nasonov E.L. Problems of immunopathology of rheumatoid arthritis: the evolution of the disease. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2017, Vol. 55, no. 3, pp. 277-294. (In Russ.)]
10. Сидорова Е.В. Долгоживущие В-клетки // Успехи современной биологии, 2013. Т. 133, № 4. С. 333-348. [Sidorova E.V. Long-lived B cells. *Uspekhi sovremennoy biologii = Successes of Modern Biology*, 2013, Vol. 133, no. 4, pp. 333-348. (In Russ.)]
11. Сизякина Л.П., Харитонов М.В. Характеристика В2-лимфоцитов у пациентов с серопозитивным ревматоидным артритом суставной формы // Иммунология, 2017. № 4. С. 226-228. [Sizyakina L.P., Kharitonova M.V. Characteristics of B2 lymphocytes in patients with seropositive rheumatoid arthritis of the articular form. *Immunologiya = Immunology*, 2017, no. 4, pp. 226-228. (In Russ.)]
12. Сизякина Л.П., Харитонов М.В. Характеристика В2-лимфоцитов у пациентов с серонегативным ревматоидным артритом суставной формы // Иммунология, 2018. Т. 39, № 2-3. С. 134-136. [Sizyakina L.P., Kharitonova M.V. Characteristics of B2 lymphocytes in patients with seronegative rheumatoid arthritis of the articular form. *Immunologiya = Immunology*, 2018, Vol. 39, no. 2-3, pp. 134-136. (In Russ.)]
13. Сизякина Л.П., Харитонов М.В. Особенности фенотипов В-лимфоцитов в зависимости от длительности течения серопозитивного варианта суставной формы ревматоидного артрита // Российский аллергологический журнал, 2019. Т. 16, № 1, ч. 2. С. 141-143. [Sizyakina L.P., Kharitonova M.V. Features of B lymphocyte phenotypes depending on the duration of the seropositive variant of the articular form of rheumatoid arthritis. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2019, Vol. 16, no. 1, Pt 2, pp. 141-143. (In Russ.)]
14. Супоницкая Е.В., Александрова Е.Н., Алексанкин А.П., Насонов Е.Л. Влияние терапии генно-инженерными биологическими препаратами на субпопуляции В-лимфоцитов при ревматических заболеваниях: новые данные // Научно-практическая ревматология, 2015. Т. 53, № 1. С. 78-83. [Suponitskaya E.V., Aleksandrova E.N., Aleksankin A.P., Nasonov E.L. The effect of therapy with genetically engineered biological preparations on subpopulations of B-lymphocytes in rheumatic diseases: new data. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2015, Vol. 53, no. 1, pp. 78-83. (In Russ.)]
15. Супоницкая Е.В., Алексанкин А.П., Александрова Е.Н., Авдеева А.С., Панафидина Т.А., Верижникова Ж.Г., Насонов Е.Л. Определение субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови методом проточной цитофлуорометрии у здоровых лиц и больных ревматическими заболеваниями // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. Т. 60, № 6. С. 30-33. [Suponitskaya E.V., Aleksankin A.P., Aleksandrova E.N., Avdeeva A.S., Panafidina T.A., Verizhnikova Zh.G., Nasonov E.L. Determination of subpopulations of peripheral blood B lymphocytes using flow cytometry in healthy individuals and patients with rheumatic diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, Vol. 60, no. 6, pp. 30-33. (In Russ.)]
16. Супрун Е.Н. Гуморальный иммунный ответ // Аллергология и иммунология в педиатрии, 2014. № 4 (39). С. 44-48. [Suprun E.N. Humoral immune response. *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergology and Immunology in Pediatrics*, 2014, no. 4 (39), pp. 44-48. (In Russ.)]
17. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
18. Adlowitz D.G., Barnard J., Biear J.N., Cistrone C., Owen T., Wang W., Palanichamy A., Ezealah E., Campbell D., Wei C., Looney R.J., Sanz I., Anolik J.H. Expansion of activated peripheral blood memory B cells in rheumatoid arthritis, impact of B cell depletion therapy, and biomarkers of response. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 6, e0128269. doi: 10.1371/journal.pone.0128269.
19. Bugatti S., Bogliolo L., Montecucco C., Manzo A. B cell autoimmunity and bone damage in rheumatoid arthritis. *Reumatismo*, 2016. Vol. 68, no. 3, pp. 117-125.
20. Bugatti S., Vitolo B., Caporali R., Montecucco C., Manzo A. B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers. *BioMed. Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 681678. doi: 10.1155/2014/681678.
21. Vale A.M., Kearney J.F., Nobrega A., Schroeder H.W. Molecular biology of B cells. 3rd ed. 2015, pp. 99-119.

Авторы:

Сизякина Л.П. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФПК и ППС, директор Научно-исследовательского института клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Харитонов М.В. — заведующая лабораторией клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Sizyakina L.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, Director, Research Institute of Clinical Immunology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Kharitonova M.V., Head, Laboratory of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 08.07.2019

Отправлена на доработку 13.09.2019

Принята к печати 22.10.2019

Received 08.07.2019

Revision received 13.09.2019

Accepted 22.10.2019

АНАЛИЗ СУБПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ ПРИ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ АКТИВНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

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

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

Резюме. Саркоидоз — воспалительное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся формированием эпителиоидно-клеточных гранул без некроза в результате гиперактивации разных клеток иммунной системы. Роль гуморальных механизмов в патогенезе саркоидоза менее изучена по сравнению с клеточно-опосредованными. Необходимо изучение роли активации или, напротив, анергии В-звена иммунитета при саркоидозе, степени его активности и особенностей клинического течения заболевания. Целью данного исследования явилось изучение особенностей субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови больных с хроническим течением ($n = 41$) саркоидоза в зависимости от активности заболевания. Контролем служили образцы периферической крови, полученные от 43 условно здоровых добровольцев. Для определения активности заболевания использовались объективные клинические и инструментальные критерии, в качестве лабораторного показателя — уровень активности АПФ (ангиотензин-конвертирующий фермент). С использованием многоцветной проточной цитометрии определялись В-лимфоциты на основе двух подходов: экспрессии IgD/CD38 (“Vml-Vm5” классификация) и IgD/CD27. Было показано, что у больных саркоидозом было достоверно выше относительное число Vm2 “активированных” “наивных” клеток (IgD⁺CD38⁺), чем у условно здоровых лиц, 65,38% против 55,66% ($p < 0,001$). Относительное и абсолютное содержание eVm5 (IgD⁺CD38⁺) и Vm5 (IgD⁺CD38⁻) клеток памяти было достоверно ниже в группе больных саркоидозом относительно группы контроля. Относительные значения: 6,59% против 13,31% ($p < 0,001$) и 3,43% против 8,49% ($p < 0,001$) соответственно. Показано, что при повышенном уровне АПФ в периферической крови больных достоверно снижено число “наивных” Vm1-клеток (IgD⁺CD38⁻), $r = -0,557$ при

Адрес для переписки:

Лазарева Наталья Михайловна
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
197022, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6-8.
Тел.: 8 (921) 394-84-20.
E-mail: nmlazareva@gmail.com

Address for correspondence:

Lazareva Natalia M.
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg,
L. Tolstoy str., 6-8.
Phone: 7 (921) 394-84-20.
E-mail: nmlazareva@gmail.com

Образец цитирования:

Н.М. Лазарева, И.В. Кудрявцев, О.П. Баранова,
М.К. Серебрякова, А.А. Бажанов, Т.П. Сесь,
М.М. Илькович, Арег А. Тотолян «Анализ субпопуляций
В-лимфоцитов в периферической крови больных
саркоидозом при разной степени активности
заболевания» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21,
№ 6. С. 1081-1098.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1081-1098

© Лазарева Н.М. и соавт., 2019

For citation:

N.M. Lazareva, I.V. Kudryavtsev, O.P. Baranova,
M.K. Serebriakova, A.A. Bazhanov, T.P. Ses', M.M. Ilkovich,
Areg A. Totolian "Peripheral blood B cell subsets from
patients with various activity of chronic sarcoidosis", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019,
Vol. 21, no. 6, pp. 1081-1098.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1081-1098

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1081-1098

$p < 0,001$. Относительное содержание В-клеток памяти, не переключивших класс синтезируемых антител ($\text{IgD}^+\text{CD27}^+$), в группе больных было снижено и составило 6,25%, а в группе контроля — 12,95% ($p < 0,001$). Число клеток памяти, переключивших класс синтезируемых антител ($\text{IgD}^+\text{CD27}^+$), было также существенно снижено у больных саркоидозом и составило 6,75% против 16,50% в контрольной группе ($p < 0,001$). У больных с высоким уровнем АПФ отмечалось повышение относительного содержания "наивных" В-клеток ($\text{IgD}^+\text{CD27}^-$), $r = 0,532$ при $p < 0,001$. Между числом В-клеток памяти ($\text{IgD}^+\text{CD27}^+$) и показателями уровня АПФ была установлена обратная зависимость, $r = -0,565$ при $p < 0,001$. Полученные данные свидетельствуют о важной роли В-клеточного иммунного ответа в патогенезе саркоидоза и дают возможность оценить особенности гуморального ответа при разной степени активности заболевания.

Ключевые слова: саркоидоз, активность заболевания, В-лимфоциты, проточная цитометрия, многоцветный анализ

PERIPHERAL BLOOD B CELL SUBSETS FROM PATIENTS WITH VARIOUS ACTIVITY OF CHRONIC SARCOIDOSIS

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

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

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

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

Abstract. Sarcoidosis is an inflammatory disease of unknown etiology, characterized by development of necrosis-free epithelioid cell granulomas, resulting in hyperactivation of various cells of the immune system. The role of humoral mechanisms in the pathogenesis of sarcoidosis is less studied than cell-mediated. It is necessary to study the role of activation or the anergy of the B cell development of immunity in sarcoidosis, the degree of its activity and the characteristics of the clinical course of the disease. Our study was aimed at investigating the characteristics of the B cells subsets in the peripheral blood of patients with chronic sarcoidosis ($n = 41$), depending on the activity of the disease. The control was peripheral blood samples from healthy volunteers ($n = 43$). Objective clinical and instrumental criteria, angiotensin converting enzyme (ACE) were used to determine the activity of the disease. Using flow cytometry analysis of peripheral blood cell B cells were determined based on two approaches: expression of $\text{IgD}/\text{CD38}$ ("Bm1-Bm5" classification) and $\text{IgD}/\text{CD27}$. In patients with sarcoidosis there was a significantly higher relative number of Bm2 "activated" naive cells ($\text{IgD}^+\text{CD38}^+$) than in conditionally healthy volunteers, 65.38% versus 55.66% ($p < 0.001$). The relative and absolute contents of eBm5 ($\text{IgD}^+\text{CD38}^+$) and Bm5 ($\text{IgD}^+\text{CD38}^-$) memory cells were significantly lower in the group of patients with sarcoidosis relative to the control group. Relative values: 6.59% versus 13.31%, ($p < 0.001$), and 3.43% versus 8.49%, ($p < 0.001$), respectively. It was shown that with an increased level of ACE in the peripheral blood of patients, the number of naïve Bm1 cells ($\text{IgD}^+\text{CD38}^-$) was significantly reduced, $r = -0.557$, $p < 0.001$. The relative content of memory B cells that did not switch the class of synthesized antibodies ($\text{IgD}^+\text{CD27}^+$) in the group of patients was reduced to 6.25%, and in the control group — 12.95% ($p < 0.001$). The number of memory cells that switched the class of synthesized antibodies ($\text{IgD}^+\text{CD27}^+$) was also significantly reduced in patients with sarcoidosis and amounted to 6.75% versus 16.50% in the control group ($p < 0.001$). In patients with high levels of ACE, there was an increase in the relative content of naïve B cells ($\text{IgD}^+\text{CD27}^-$), $r = 0.532$, $p < 0.001$. An inverse relationship was established between the number of memory B cells ($\text{IgD}^+\text{CD27}^+$) and ACE levels, $r = -0.565$, $p < 0.001$. These results indicate the important role of the B cell immune response in the pathogenesis of sarcoidosis and make it possible to evaluate the characteristics of the humoral response with various degrees of disease activity.

Keywords: sarcoidosis, disease activity, B cells, flow cytometry, multicolor immunophenotyping

Введение

Саркоидоз — воспалительное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся формированием эпителиоидно-клеточных гранул без некроза, мультисистемным поражением различных органов и тканей, преимущественно внутригрудных лимфатических узлов, легких, реже других органов [1, 2].

Развитие саркоидоза является следствием взаимодействия экзогенных, окончательно не установленных, факторов на организм человека и генетической предрасположенности к формированию избыточно сильных иммунных ответов на такие факторы.

При саркоидозе происходит гиперактивация клеток иммунной системы, продуцируемые цитокины и хемокины играют важную роль в процессе гранулемообразования [40]. Согласно современным представлениям, клеточно-опосредованные реакции являются основными в патогенезе саркоидоза. В развитии таких реакций участвуют разные субпопуляции Т-хелперов: 1 типа (Th1), 17 типа (Th17), а также относительно недавно описанные «неклассические», «пластичные» субпопуляции Т-хелперов: Th1/Th17 и Th17.1 [20, 37, 40]. Считают, что именно «неклассические» субпопуляции Т-хелперов во многом определяют характер клинического течения саркоидоза благодаря их способности активировать макрофаги и нейтрофилы в очаге воспаления [12, 40, 43].

Эффективность механизмов сдерживания избыточно сильных иммунных реакций при саркоидозе, как и при других заболеваниях, определяется поддержанием баланса активности провоспалительных субпопуляций Т-хелперов (Th1/Th17/Th17) и Т-хелперов с иммуnoreгуляторными свойствами — так называемых Т-регуляторных лимфоцитов (Tregs) [24, 32, 40].

Роль гуморальных механизмов в патогенезе саркоидоза менее изучена по сравнению с клеточно-опосредованными. Повышенные уровни IgG-антител к ряду аутоантигенов (циклические цитруллинированные пептиды, антинуклеарные антитела, антитела к двуспиральной ДНК и ряд других) могут определяться в сыворотке крови и бронхоальвеолярном лаваже больных саркоидозом [28, 29, 46]. Эти и другие данные свидетельствуют о том, что, наряду с клеточно-опосредованными реакциями, в патогенезе саркоидоза могут принимать участие и циркулирующие аутоантитела, преимущественно класса IgG [12, 23, 40]. В других работах, напротив, указывают на отсутствие отличий уровней IgG-антител у больных саркоидозом и у здоровых лиц [8, 25]. Таким образом, в настоящее время роль гуморальных ме-

ханизмов в патогенезе саркоидоза окончательно не ясна.

Какова же роль активации или, напротив, анергии В-звена иммунитета при саркоидозе? Вероятно, это во многом коррелирует с особенностями клинического течения заболевания. При активном течении саркоидоза, характеризующимся лучшим прогнозом и возможностью спонтанной ремиссии, в периферической крови больных отмечается повышенное содержание «переходных» субпопуляций В-лимфоцитов и «регуляторных» В-лимфоцитов, продуцирующих IL-10 [41]. При тяжелом прогрессирующем течении саркоидоза в периферической крови больных отмечается анергия В-лимфоцитов, В-клеточная лимфопения и существенное снижение числа В-клеток памяти [31].

Результаты гистологического исследования биопсионных образцов легочной ткани у больных саркоидозом при остром и при хроническом течении заболевания свидетельствуют о присутствии в гранулемах В-лимфоцитов и плазматических клеток [12, 40].

Анализ литературы показал, что часть авторов склоняется к ведущей роли активации или анергии В-лимфоцитов в патогенезе саркоидоза, а другие связывают более тяжелое течение саркоидоза с гиперактивацией В-звена иммунитета и образованием антицитруллиновых аутоантител. Косвенным подтверждением правомочности последнего положения являются положительные результаты включения таргетной анти-В-клеточной терапии ритуксимабом в общую схему лечения больных саркоидозом [9, 11].

Необходимы объективные критерии для сопоставления иммунологических параметров и клинико-лабораторных показателей активности заболевания с целью выбора возможных предикторов спонтанной ремиссии заболевания вследствие активации иммуnoreгуляторных механизмов, направленных на сдерживание гиперчувствительных реакций в пораженных органах и тканях. Назначение иммуносупрессивной терапии у таких больных может исключить возможность развития спонтанной ремиссии.

Наряду с существующими, но не оптимальными, клиническими и инструментальными критериями активности саркоидоза, существуют лабораторные критерии, которые носят дискуссионный характер. Следует отметить, что в целом в настоящее время лабораторные критерии постановки диагноза «саркоидоз» отсутствуют. Ранее для оценки активности саркоидоза широко использовали так называемый иммуnoreгуляторный индекс, представляющий соотношение Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов в бронхоальвеолярном лаваже. В последние деся-

титетия в качестве возможных диагностических маркеров саркоидоза изучены новые показатели, в том числе растворимый рецептор интерлейкина-2 (sIL-2), хитотриозидаза, сывороточный амилоид А и ряд других. Однако критериев, соответствующих «золотому стандарту лабораторной диагностики» с целью более ранней постановки диагноза «саркоидоз», в настоящее время не существует [14, 15, 17, 21, 22].

Одним из лабораторных критериев, успешно применяющихся для оценки активности саркоидоза, является уровень ангиотензин-конвертирующего фермента (АПФ) в периферической крови больных. Исследования, посвященные изучению содержания АПФ, свидетельствуют, что при одних заболеваниях (саркоидоз, фиброзирующий альвеолит, пневмония) этот показатель может существенно повышаться, а при других (туберкулез, муковисцидоз), напротив, снижаться по сравнению с нормой [13, 15, 17, 26].

Изначально АПФ является мембраносвязанным белком, экспрессирующимся на поверхности многих типов клеток, а в циркуляцию АПФ попадает в результате протеолитического расщепления. У здоровых уровень АПФ в сыворотке крови составляет менее 70 (ACE Unit). В норме АПФ выполняет целый ряд важных функций. Металлопротеиназа АПФ катализирует выработку ангиотензина II путем превращения из ангиотензина I, инактивирует брадикинин через ренин-ангиотензиновую систему и тем самым участвует в поддержании артериального давления. Наряду с функцией контроля показателей артериального давления, АПФ участвует в развитии тканей почки, эритропоэзе, миелопоэзе и развитии иммунных ответов [10].

В патологических условиях фермент может избыточно продуцироваться альвеолярными макрофагами и гранулоцитами. Считается, что основными продуцентами АПФ в гранулемах при саркоидозе служат эпителиоидные клетки, образующиеся из гиперактивированных провоспалительными цитокинами макрофагов. Поскольку сывороточный АПФ происходит в основном из микроциркуляторного русла легочной ткани, при развитии активного гранулематозного воспаления при саркоидозе в кровоток попадает существенно большее количество АПФ [17, 27, 47]. У детей младшего возраста уровень АПФ варьирует, по этой причине этот биомаркер обычно не используют в клинической практике [1].

У взрослых повышенные уровни АПФ при саркоидозе коррелируют с распространенностью гранулематозного процесса в различных органах и тканях и с тяжестью заболевания [27]. Таким образом, высокие уровни АПФ в сыворотке крови больных саркоидозом используют

в качестве маркера активности заболевания [19, 33, 36, 38, 45].

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови больных с хроническим течением саркоидоза в зависимости от активности заболевания.

Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием K_3 ЭДТА, больных хроническим дебютом саркоидоза ($n = 41$) в возрасте 20-65 лет, не получавших иммуносупрессивную терапию, в том числе системные кортикостероиды, и плазмаферез. Все больные саркоидозом проходили обследование на базе клиники НИИ интерстициальных и орфанных заболеваний легких при ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России. Диагноз «саркоидоз» был подтвержден с помощью гистологического исследования у 85% (35/41) больных и по клиничко-рентгенологическим данным у 15% (6/41) больных. В качестве контроля использовали образцы периферической крови 43 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными саркоидозом. Все исследования были проведены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Анализ иммунологических параметров проводили в сопоставлении с активностью заболевания, определяемой по ряду клинических, инструментальных и лабораторных показателей. При обследовании больных учитывались появление жалоб, симптомов, системности поражений в разных органах, увеличение давления в легочной артерии (рЛА, мм рт. ст.) по данным эхокардиографического исследования (ЭХО-КГ), увеличение лимфоузлов, нарастание изменений в легочной ткани, распространенности очагов поражений, появление и прогрессирование признаков фиброза и другие проявления неблагоприятного течения саркоидоза по данным мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ), изменения показателей функции внешнего дыхания, в том числе оценивали снижение диффузионной способности легких (DLCO, %).

В качестве лабораторного показателя активности использовали определение уровня АПФ. Активность АПФ определялась в сыворотке крови и измерялась в единицах активности ACE Unit (= 1 IU/ml) с помощью колориметрического теста с пептидным субстратом. Положительным считался результат активности АПФ больше 70 ACE Unit, референсные значения для лиц старше 18 лет составляли 20–70 ACE Unit.

Все лабораторные исследования проводились в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными С.В. Хайдуковым и соавт. [4]. Для выявления популяции В-лимфоцитов периферической крови использовали антитела против CD45 (клон J33, кат. № A96416) и CD19 (клон J3-119, кат. № A94681), конъюгированными с Krome Orange и APC-AlexaFluor750 соответственно. Для анализа распределения В-лимфоцитов по основным субпопуляциям применяли антитела против поверхностных IgD (клон IA6-2, кат. № B30652), CD38 (клон LS198-4-3, кат. № A07779) и CD27 (клон 1A4CD27, кат. № A54823), конъюгированными с FITC, PE и PC7 соответственно. Все использованные в работе антитела были производства Beckman Coulter Inc. (США). Окраску антителами производили в соответствии с рекомендациями производителя. Удаление эритроцитов из образцов осуществляли при помощи коммерческого лизирующего раствора VersaLyse (кат. № A09777), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800). По завершении инкубации образцы однократно отмывали от несвязавшихся антител избытком забуференного фосфатами физиологического раствора (7 минут при 330 g), а полученный клеточный осадок ресуспендировали в 200 мкл забуференного фосфатами физиологического раствора, содержавшего 2% нейтрального параформальдегида (кат. № HT5011, Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов проводился при помощи проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, Inc., США), оснащенного тремя лазерами с длинами волн излучения 405, 488 и 638 нм. В каждом образце анализировалось не менее 5000 CD19⁺В-лимфоцитов периферической крови.

Выявления основных стадий дифференцировки В-лимфоцитов производили на основе анализа коэкспрессии IgD и CD38, а также IgD и CD27, как это было описано нами ранее [3].

Окраска антителами против IgD и CD38 позволяет идентифицировать следующие популяции В-клеток:

- наивные Вm1-клетки с фенотипом IgD⁺CD38⁻;
- активированные наивные Вm2-клетки (IgD⁺CD38⁺);
- Вm2' – клетки-предшественники В-клеток зародышевых центров периферических лимфоидных органов (IgD⁺CD38⁺⁺);
- общая субпопуляция, включающая в себя центробласты и центроциты – так называемые Вm3+Вm4 клетки (IgD⁻CD38⁺⁺);
- клетки ранней памяти eВm5 (IgD⁻CD38⁺);
- покоящиеся клетки памяти Вm5 (IgD⁻CD38⁻).

Оценка коэкспрессии IgD и CD27 позволяет разделить общий пул В-лимфоцитов на наивные клетки с фенотипом IgD⁺CD27⁻ и три типа В-клеток памяти:

- клетки памяти с непереключенным классом синтезируемых антител (так называемые unswitched memory, IgD⁺CD27⁺);
- клетки памяти с переключенным классом синтезируемых антител (так называемые class-switched memory, IgD⁻CD27⁺);
- так называемые дважды негативные клетки памяти (IgD⁻CD27⁻).

Метод позволяет также определять субпопуляции циркулирующих предшественников плазматических клеток с фенотипом IgD⁻CD27⁺⁺.

Обработку цитофлуориметрических результатов проводили при помощи программ Navios Software v. 1.2 и Kaluza™ v. 1.2 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили при помощи пакетов программ Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Полученные результаты по относительному и абсолютному содержанию В-лимфоцитов различных популяций приводили в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Для сравнения полученных выборок использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции г Спирмена.

Результаты

Активность АПФ в группе больных саркоидозом была выше нормы (более 70 ACE Unit) в 63% (26/41) случаев, нормальный уровень АПФ отмечался у 37 % (15/41). В соответствии с этим нами были выделены две основные подгруппы пациентов: I подгруппа – больные с нормальным уровнем АПФ, II подгруппа – больные с повышенным уровнем АПФ в сыворотке крови.

У больных саркоидозом с нормальными показателями АПФ жалобы и симптомы были минимальными и отмечались лишь у 6 из 15 (40%),

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ, ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ОБСЛЕДУЕМЫХ ГРУПП БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ

TABLE 1. CLINICAL, INSTRUMENTAL AND LABORATORY PARAMETERS IN GROUPS OF PATIENTS WITH SARCOIDOSIS

Параметры Parameters	Группа больных саркоидозом Group of patients with sarcoidosis	
	I (n = 15)	II (n = 26)
АПФ* ACE*	≤ 70 ACE Unit	> 70 ACE Unit
Наличие жалоб, симптомов Complaints, clinical symptoms	6/15 (40%)	23/26 (88%)
Проявления системности (гепато/ спленомегалия, артралгии и др.) Systemic manifestations (hepato/splenomegaly, arthralgia, etc.)	2/15 (13%)	13/26 (50%)
Ухудшения по МСКТ** легких (внутригрудная лимфаденопатия и/или очаги в легких) СТ** evidence (hilar lymphadenopathy and/or chest micronodules)	2/15 (13%)	15/26 (58%)
Увеличение давления в ЛА*** (р выше 30 мм рт. ст.) РА*** pressure increase (> 30 mmHg)	2/15 (13%)	5/26 (19%)
Изменения по КИФВД**** Changes in LFG****	3/15 (15%)	2/26 (8%)

Примечание. I подгруппа – больные с нормальными уровнями АПФ, II подгруппа – больные с повышенными уровнями АПФ в сыворотке крови. * – уровень активности ангиотензин-превращающего фермента; ** – мультиспиральная компьютерная томография; *** – легочная артерия; **** – комплексное исследование функции внешнего дыхания.

Note. Group I, sarcoidosis patients with normal ACE levels (≤ 70 ACE Unit); group II, sarcoidosis patients with increased ACE levels (> 70 ACE Unit). *, angiotensin-converting enzyme; **, computed tomography; ***, pulmonary artery; ****, lung function testing.

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ И АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ В-КЛЕТОК РАЗНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ НА ОСНОВАНИИ “ВМ1-ВМ5” КЛАССИФИКАЦИИ, У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ САРКОИДОЗОМ (n = 41) И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ (n = 43), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. RELATIVE AND ABSOLUTE OF B CELL SUBSETS USING “BM1-BM5” CLASSIFICATION IN SARCOIDOSIS PATIENTS (SP, n = 41) VERSUS HEALTHY CONTROL (HC, n = 43), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Субпопуляции В-клеток B cell subsets		Саркоидоз SP	Контроль HC	p
Bm1, IgD ⁺ CD38 ⁻	%	4,87 (3,21-8,57)	11,33 (7,52-16,79)	p < 0,001
	#	10 (6-19)	26 (16-38)	p < 0,001
Bm2, IgD ⁺ CD38 ⁺	%	65,38 (58,86-70,61)	55,66 (48,48-63,29)	p < 0,001
	#	140 (78,88-177,81)	116 (83-184)	p = 0,830
Bm2', IgD ⁺ CD38 ⁺⁺	%	15,05 (12,48-19,60)	6,46 (4,39-10,06)	p < 0,001
	#	28 (15-48)	15 (8-24)	p < 0,001
Bm3+Bm4, IgD ⁻ CD38 ⁺⁺	%	1,14 (0,78-1,75)	0,72 (0,49-1,13)	p = 0,006
	#	2 (1-4)	2 (1-2)	p = 0,060
eBm5, IgD ⁻ CD38 ⁺	%	6,59 (4,15-10,18)	13,31 (10,02-16,75)	p < 0,001
	#	12 (7-21)	33 (22-40)	p < 0,001
Bm5, IgD ⁻ CD38 ⁻	%	3,43 (2,64-4,87)	8,49 (6,21-11,06)	p < 0,001
	#	7 (3-11)	18 (13-25)	p < 0,001

Примечание. % – процент от общей популяции CD19⁺ клеток; # – абсолютные значения, количество клеток в 1 мкл крови.

Note. %, with CD19⁺ subset. #, number of cells in 1 µl of peripheral blood.

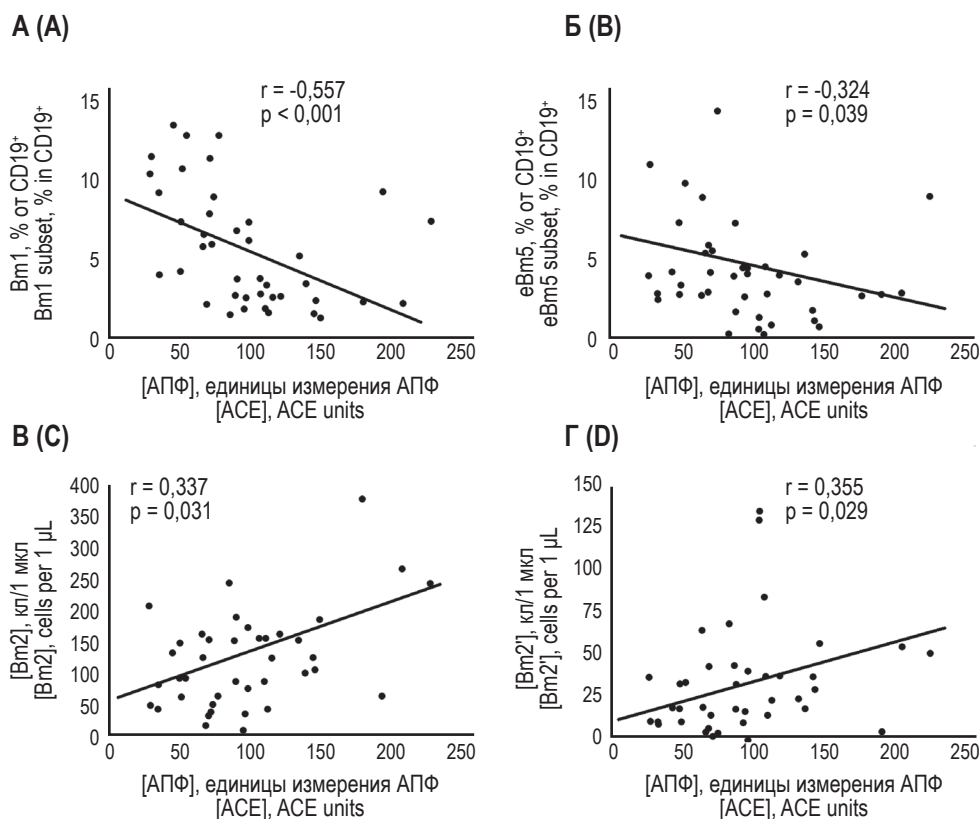


Рисунок 1. Взаимосвязь между уровнем АПФ и субпопуляциями В-лимфоцитов, выявленными с применением “Bm1-Bm5” классификации

Примечание. А – корреляционный анализ между относительным содержанием наивных Вm1-клеток ($\text{IgD}^+\text{CD}38^-$) и активностью АПФ. Б – корреляционный анализ между относительным содержанием клеток ранней памяти eBm5 ($\text{IgD}^+\text{CD}38^+$) и активностью АПФ. В – корреляционный анализ между абсолютным содержанием активированных наивных Вm2-клеток ($\text{IgD}^+\text{CD}38^+$) и активностью АПФ. Г – корреляционный анализ между абсолютным содержанием Вm2' – клеток-предшественников В-клеток зародышевых центров периферических лимфоидных органов ($\text{IgD}^+\text{CD}38^{++}$) и активностью АПФ.

Figure 1. Correlations between ACE levels and B cell subsets using “Bm1-Bm5” classification in sarcoidosis patients according to Spearman rank correlation test

Note. A, relative numbers of naïve B cells. B, relative numbers of eBm5 cells. C, absolute numbers of Bm2 cells. D, absolute numbers of Bm2' cells.

в то время как у больных II подгруппы с высокими уровнями АПФ выраженные клинические проявления активности заболевания, в том числе указывающие на наличие системности патологического процесса, отмечались у 23 из 26 обследованных (88%).

В таблице 1 представлено сравнение клинических проявлений активности заболевания в подгруппах обследованных пациентов.

При оценке относительного и абсолютного числа $\text{CD}19^+$ В-лимфоцитов в периферической крови больных саркоидозом и у здоровых лиц достоверных различий не выявлено. Относительное число $\text{CD}19^+$ клеток у пациентов составило 14,20% (9,98-17,18), у здоровых – 13,78% (9,71-15,48) от общего числа циркулирующих лимфоцитов соответственно ($p = 0,364$), абсолютное число $\text{CD}19^+$ клеток составило 209 кл/мкл

(119-285) и 234 кл/мкл (163-305) соответственно ($p = 0,229$).

В таблице 2 представлены данные субпопуляционного состава В-лимфоцитов, полученные на основе “Bm1-Bm5” классификации.

У больных саркоидозом среди всех В-лимфоцитов было достоверно выше относительное число Вm2 активированных наивных клеток ($\text{IgD}^+\text{CD}38^+$), чем у условно здоровых лиц, 65,38 против 55,66% ($p < 0,001$).

Относительное и абсолютное содержание eBm5 ($\text{IgD}^+\text{CD}38^+$) и Вm5 ($\text{IgD}^+\text{CD}38^-$) клеток памяти было достоверно ниже в группе больных саркоидозом относительно группы контроля. Относительные значения составили 6,59 против 13,31% ($p < 0,001$) и 3,43 против 8,49% ($p < 0,001$) соответственно.

Проведение корреляционного анализа выявило зависимость между повышением уровня

ТАБЛИЦА 3. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ И АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАЗНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ НА ОСНОВАНИИ “BM1-BM5” КЛАССИФИКАЦИИ, У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ С НОРМАЛЬНЫМ (n = 15) И ПОВЫШЕННЫМ (n = 26) УРОВНЯМИ АПФ И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ (n = 43), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. RELATIVE AND ABSOLUTE OF B CELL SUBSETS USING “BM1-BM5” CLASSIFICATION IN SARCOIDOSIS PATIENTS WITH NORMAL (GROUP 1, n = 15) OR INCREASED ACE (GROUP 2, n = 26) LEVELS VERSUS HEALTHY CONTROL (n = 43), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Субпопуляции В-клеток B cell subset		Саркоидоз I подгруппа Sarcoidosis Group 1	Саркоидоз II подгруппа Sarcoidosis Group 2	Контроль Healthy control	p
Bm1, IgD ⁺ CD38 ⁻	%	8,57 (6,45-12,09)	3,39 (2,85-6,85)	11,33 (7,52-16,79)	p ₁₋₃ = 0,008 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,11
	#	15 (6-30)	9 (5-14)	26 (16-38)	p ₁₋₃ = 0,04 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ < 0,001
Bm2, IgD ⁺ CD38 ⁺	%	62,77 (57,36-67,44)	68,82 (58,86-72,13)	55,66 (48,48-63,29)	p ₁₋₃ = 0,02 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,14
	#	107 (58-164)	154 (91-201)	116 (83-184)	p ₁₋₃ = 0,27 p ₂₋₃ = 0,29 p ₁₋₂ = 0,08
Bm2', IgD ⁺ CD38 ⁺⁺	%	14,88 (11,73-16,15)	15,77 (13,01-20,92)	6,46 (4,39-10,06)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,22
	#	22 (14-38)	39 (21-59)	15 (8-24)	p ₁₋₃ = 0,09 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,11
Bm3+Bm4, IgD ⁻ CD38 ⁺⁺	%	1,54 (0,78-2,43)	1,02 (0,68-1,46)	0,72 (0,49-1,13)	p ₁₋₃ = 0,002 p ₂₋₃ = 0,088 p ₁₋₂ = 0,098
	#	3 (1-5)	2 (1-4)	2 (1-2)	p ₁₋₃ = 0,08 p ₂₋₃ = 0,16 p ₁₋₂ = 0,46
eBm5, IgD ⁻ CD38 ⁺	%	6,92 (5,05-10,22)	6,03 (4,11-9,18)	13,31 (10,02-16,75)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,48
	#	8 (6-21)	13 (7-20)	33 (22-40)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,49
Bm5, IgD ⁻ CD38 ⁻	%	3,92 (2,82-6,49)	2,82 (1,56-4,15)	8,49 (6,21-11,06)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,05
	#	8 (3-12)	4,91 (2,85-10,55)	18 (13-25)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,46

Примечание. % – процент от общей популяции CD19⁺ клеток; # – абсолютные значения, количество клеток в 1 мкл крови. p₁₋₃ – статистически значимые различия между показателями контрольной группы и I подгруппы больных; p₂₋₃ – статистически значимые различия между показателями контрольной группы и II подгруппы больных; p₁₋₂ – статистически значимые различия между показателями больных I и II подгрупп. Статистический анализ проводился с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Note. %, with CD19⁺ subset. #, number of cells in 1 µl of peripheral blood. p₁₋₃, statistically significant differences between sarcoidosis group 1 and healthy control; p₂₋₃, statistically significant differences between sarcoidosis group 2 and healthy control; p₁₋₂, statistically significant differences between patients group 1 and 2. Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney U test.

АПФ и приростом относительного содержания В-клеток в рамках общего пула циркулирующих лимфоцитов у больных саркоидозом ($r = 0,316$ при $p = 0,044$).

Результаты корреляционного анализа субпопуляций В-лимфоцитов и активности АПФ приведены на рисунке 1.

Показано, что при повышенном уровне АПФ в периферической крови больных достоверно снижено число наивных Vm1-клеток с фенотипом IgD^+CD38^- и клеток ранней памяти eVm5 с фенотипом IgD^-CD38^- ($r = -0,557$ при $p < 0,001$ и $r = -0,324$ при $p = 0,039$ соответственно). При этом абсолютное число активированных наивных В-лимфоцитов популяции Vm2 ($r = 0,337$ при $p = 0,031$) и клеток-предшественников В-лимфоцитов зародышевых центров периферических лимфоидных органов с фенотипом IgD^+CD38^{++} повышено ($r = 0,355$ при $p = 0,029$).

Относительное и абсолютное число субпопуляций В-лимфоцитов, выделяемых на основании "Vm1-Vm5" классификации, у больных саркоидозом с нормальным (I подгруппа) и повышенным (II подгруппа) уровнями активности АПФ, а также в группе контроля, представлены в таблице 3.

Было отмечено, что относительное и абсолютное содержание наивных Vm1-клеток (IgD^+CD38^-) достоверно ниже как у пациентов с нормальной, так и с высокой активностью АПФ относительно контрольной группы.

Количество Vm2 активированных наивных клеток с фенотипом IgD^+CD38^+ достоверно повышено в обеих группах больных саркоидозом по сравнению с контрольной группой: 62,77 против 55,66% ($p = 0,02$) и 68,82 против 55,66% ($p < 0,001$). Относительное и абсолютное содержание eVm5 (IgD^-CD38^+) и Vm5 (IgD^-CD38^-) клеток памяти было достоверно ниже в группе больных саркоидозом как с нормальной, так и высокой активностью АПФ относительно группы контроля ($p < 0,001$).

Анализ субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови больных хроническим саркоидозом и практически здоровых лиц, на основе " IgD^- против $CD27^-$ " классификации, представлен в таблице 4.

Следует отметить, что относительное содержание наивных IgD^+CD27^- клеток среди общей популяции $CD19^+$ лимфоцитов было достоверно выше у больных саркоидозом и составило 81,35%, в то время как в группе контроля – 60,91% ($p < 0,001$). При этом число В-клеток памяти и клеток-предшественников клеток памяти в образцах крови больных саркоидозом относительно контроля было снижено. Относительное содержание В-клеток памяти, не переключивших класс синтезируемых антител (IgD^+CD27^+), в группе больных было снижено и составило 6,25%, а в группе контроля – 12,95% ($p < 0,001$). Число клеток памяти, переключивших класс синтезируемых антител (IgD^-CD27^+), было также существенно снижено у больных саркоидозом

ТАБЛИЦА 4. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ И АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ В-КЛЕТОК РАЗНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ НА ОСНОВАНИИ ЭКСПРЕССИИ IgD И $CD27$, У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ САРКОИДОЗОМ ($n = 41$) И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ ($n = 43$), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 4. RELATIVE AND ABSOLUTE OF B CELL SUBSETS WITH DIFFERENT PATTERNS OF IgD -vs- $CD27$ EXPRESSION IN SARCOIDOSIS PATIENTS (SP, $n = 41$) VERSUS HEALTHY CONTROL (HC, $n = 43$), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Субпопуляции В-клеток B cell subsets		Саркоидоз SP	Контроль HC	p
IgD^+CD27^-	%	81,35 (75,57-87,61)	60,91 (54,16-72,42)	$p < 0,001$
	#	166 (85-235)	136 (91-190)	$p = 0,28$
IgD^+CD27^+	%	6,25 (4,05-10,13)	12,95 (9,37-19,69)	$p < 0,001$
	#	13 (7-22)	31 (21-43)	$p < 0,001$
IgD^-CD27^+	%	6,75 (4,06-11,60)	16,50 (13,01-21,91)	$p < 0,001$
	#	12 (7-22)	37 (29-51)	$p < 0,001$
IgD^-CD27^-	%	3,07 (2,15-4,55)	4,77 (3,17-5,83)	$p < 0,001$
	#	6 (3-8)	10 (7-14)	$p < 0,001$
IgD^-CD27^{++}	%	0,28 (0,16-0,52)	0,45 (0,31-0,69)	$p = 0,008$
	#	1 (0-1)	1 (1-2)	$p = 0,003$

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

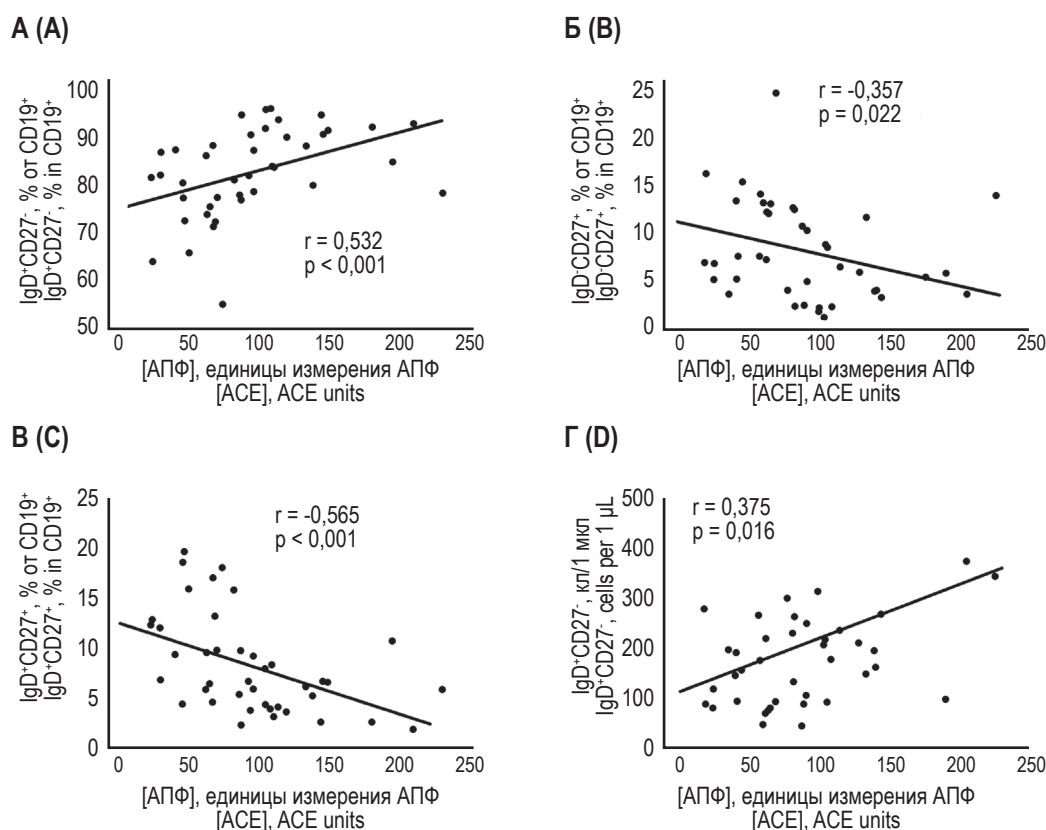


Рисунок 2. Взаимосвязь между уровнем АПФ и субпопуляциями В-лимфоцитов, выявленными на основании экспрессии IgD и CD27

Примечание. А – корреляционный анализ между относительным содержанием наивных клеток (IgD⁺CD27⁻) и активностью АПФ. Б – корреляционный анализ между относительным содержанием клеток памяти с переключенным классом синтезируемых антител (class-switched memory, IgD⁺CD27⁺) и активностью АПФ. В – корреляционный анализ между относительным содержанием клеток памяти с непереключенным классом синтезируемых антител (unswitched memory, IgD⁺CD27⁻) и активностью АПФ. Г – корреляционный анализ между абсолютным содержанием наивных клеток (IgD⁺CD27⁻) и активностью АПФ.

Figure 2. Correlations between ACE levels and B cell subsets with different patterns of IgD-vs-CD27 expression in sarcoidosis patients according to Spearman rank correlation test

Note. A, relative numbers of naïve IgD⁺CD27⁻ B cells. B, relative numbers of class-switched memory IgD⁺CD27⁺ B cells. C, absolute numbers of unswitched memory IgD⁺CD27⁻ B cells. D, absolute numbers of naïve IgD⁺CD27⁻ B cells.

и составило 6,75 против 16,50% в контрольной группе ($p < 0,001$). Содержание «дважды негативных» клеток с фенотипом IgD⁺CD27⁻ составило 3,07 и 4,77% в исследованных группах соответственно ($p < 0,001$).

Результаты анализа зависимости между уровнем сывороточного АПФ и различными популяциями В-лимфоцитов периферической крови, выявленных на основании коэкспрессии IgD и CD27, приведены на рисунке 2.

Так, у больных с повышенным уровнем АПФ отмечалось увеличением не только относительного содержания наивных В-клеток с фенотипом IgD⁺CD27⁻ ($r = 0,532$ при $p < 0,001$), но и их концентрации ($r = 0,375$ при $p = 0,016$). Интересно, что между числом В-лимфоцитов, принадлежа-

щих к популяции В-клеток памяти с фенотипами IgD⁺CD27⁺, IgD⁺CD27⁻ и показателями уровня АПФ была установлена обратная зависимость ($r = -0,565$ при $p < 0,001$ и $r = -0,357$ при $p = 0,022$ соответственно).

Относительное и абсолютное содержание разных субпопуляций В-лимфоцитов, выделяемых на основании экспрессии IgD и CD27, у больных саркоидозом с нормальным и повышенным уровнями активности АПФ, а также в группе контроля, представлены в таблице 5.

Так, среди всех CD19⁺ клеток у больных хроническим течением саркоидоза, как с высокой, так и с низкой активностью АПФ, было достоверно повышено число наивных клеток (IgD⁺CD27⁻) относительно контрольной группы. Значения

ТАБЛИЦА 5. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ И АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАЗНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ НА ОСНОВАНИИ ЭКСПРЕССИИ IgD И CD27, У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ С НОРМАЛЬНЫМ (n = 15) И ПОВЫШЕННЫМ (n = 26) АПФ И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ (n = 43), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 5. RELATIVE AND ABSOLUTE OF B CELL SUBSETS WITH DIFFERENT PATTERNS OF IgD-vs-CD27 EXPRESSION IN SARCOIDOSIS PATIENTS WITH NORMAL (GROUP 1, n = 15) OR INCREASED ACE (GROUP 2, n = 26) LEVELS VERSUS HEALTHY CONTROL (n = 43), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Субпопуляции В-клеток B cell subsets		Саркоидоз I подгруппа Sarcoidosis Group 1	Саркоидоз II подгруппа Sarcoidosis Group 2	Контроль Healthy control	p
IgD ⁺ CD27 ⁻	%	75,47 (70,89-83,62)	85,04 (77,89-89,09)	60,91 (54,16-72,42)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,003
	#	135 (71-184)	195 (96-253)	136 (91-190)	p ₁₋₃ = 0,65 p ₂₋₃ = 0,07 p ₁₋₂ = 0,05
IgD ⁺ CD27 ⁺	%	11,43 (6,04-15,15)	5,48 (3,47-7,85)	12,95 (9,37-19,69)	p ₁₋₃ = 0,035 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,003
	#	16 (8-34)	11 (6-20)	31 (21-43)	p ₁₋₃ = 0,003 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,21
IgD ⁻ CD27 ⁺	%	7,35 (6,63-12,66)	5,53 (3,34-10,22)	16,50 (13,01-21,91)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,026
	#	12 (8,05-22,34)	13 (7-21)	37 (29-51)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ = 0,61
IgD ⁻ CD27 ⁻	%	3,32 (2,39-4,65)	3,07 (1,93-4,55)	4,77 (3,17-5,83)	p ₁₋₃ = 0,01 p ₂₋₃ = 0,003 p ₁₋₂ = 0,89
	#	6 (3-8)	6 (4-10)	10 (7-14)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,006 p ₁₋₂ = 0,36
IgD ⁻ CD27 ⁺⁺	%	0,34 (0,21-1,17)	0,22 (0,10-0,50)	0,45 (0,31-0,69)	p ₁₋₃ = 0,56 p ₂₋₃ = 0,001 p ₁₋₂ = 0,04
	#	1 (0-1)	1 (0-1)	1 (1-2)	p ₁₋₃ = 0,14 p ₂₋₃ = 0,002 p ₁₋₂ = 0,16

Примечание. См. примечание к таблице 3.

Note. As for Table 3.

составили 75,47% в группе пациентов с нормальными значениями АПФ и 85,04% при высоких уровнях АПФ относительно 60,91% в образцах контрольной группы (p < 0,001).

Количество В-клеток памяти и клеток-предшественников клеток памяти в образцах крови больных саркоидозом было снижено в группе как с нормальной, так и повышенной активностью АПФ, относительно образцов группы контроля. Относительное содержание В-клеток памяти, которые еще не переключили класс синтезируемых антител (IgD⁺CD27⁺), в первой группе больных

составило 11,43%, во второй группе больных — 5,48%, что было достоверно ниже, чем в группе контроля — 12,95%, при p₁₋₃ = 0,035 и p₂₋₃ < 0,001 соответственно. Количество клеток памяти, переключивших класс синтезируемых антител (IgD⁻CD27⁺), составило 7,35 и 5,53% у пациентов с нормальной и высокой активностью АПФ, эти показатели были достоверно ниже у больных саркоидозом по сравнению с контрольной группой (16,50%), p < 0,001.

Относительное число В-лимфоцитов с фенотипами IgD⁺CD27⁺ и IgD⁻CD27⁺ было достовер-

но снижено в группе больных с высоким уровнем АПФ относительно группы больных с нормальным уровнем АПФ при $p_{1-2} = 0,003$ и $p_{1-2} = 0,026$ соответственно.

Обсуждение

Для клинко-иммунологических сопоставлений необходимы объективные критерии, позволяющие оценить активность воспалительного процесса, особенности клинического течения, эффективность проводимой терапии, прогноз заболевания.

Комплексность оценки наиболее значимых клинко-иммунологических показателей с целью поиска предикторов спонтанной ремиссии, риска рецидива заболевания, исхода воспалительного процесса в стадию фиброза обычно проводят с помощью ретроспективного анализа. В данной работе стояла задача анализа изменений изучаемых субпопуляций В-лимфоцитов в крови больных первично-хроническим саркоидозом в зависимости от степени активности заболевания.

Поскольку АПФ секретируется эпителиоидными клетками, активированными макрофагами, и его уровень в сыворотке крови коррелирует с объемом гранулем, многие авторы отмечают правомерность использования этого параметра для оценки вероятности развития фиброза легких при системном саркоидозе, а также при саркоидоз-ассоциированном увеите [6, 19, 35].

В настоящем исследовании выполнен анализ целого ряда клинко-лабораторных параметров (табл. 1), и обнаружено, что уровень АПФ, наряду с другими показателями, может служить для объективизации оценки активности хронического воспалительного процесса. Среди обследованных не леченных кортикостероидными препаратами больных саркоидозом с первично-хроническим течением заболевания, были выделены две подгруппы. В первую подгруппу вошли 15 пациентов с менее выраженными показателями активности патологического процесса и с нормальным уровнем АПФ в крови, во вторую подгруппу — 26 пациентов с повышенным уровнем АПФ и более выраженными, по сравнению с первой группой, клиническими изменениями, оцениваемыми по объективным критериям (табл. 1).

Такое распределение пациентов на группы сравнения способствует более четкому анализу возможной патогенетической и клинко-диагностической значимости изучаемых в работе иммунологических параметров.

Достоверность различий в числе разных субпопуляций В-лимфоцитов, циркулирующих в периферической крови больных саркоидозом, а также сравнение этих показателей с числом В-лимфоцитов на разной стадии дифференци-

ровки у здоровых лиц позволило сделать предположения об особенностях гуморального звена иммунитета у больных с первично-хронической формой саркоидоза при разной степени активности заболевания.

Выполненные в работе исследования не являются рутинными, однако полученные данные способствуют выбору наиболее информативных для клинической практики форматов при изучении субпопуляций лимфоцитов крови с использованием “Вm1-Вm5” классификации или на основании экспрессии молекул IgD и CD27 на поверхности В-клеток.

Как видно из таблицы 2, при анализе субпопуляций В-лимфоцитов с помощью маркеров “Вm1-Вm5” классификации, в целом по группе всех обследованных больных саркоидозом ($n = 41$), содержание изученных субпопуляций в крови отличалось по большинству параметров от показателей у здоровых лиц, за исключением Вm3+Вm4 лимфоцитов с фенотипом IgD⁻CD38⁺⁺, представляющих общую субпопуляцию centroцитов и centroбластов, присутствующих в основном во вторичных органах иммунитета.

Большинство исследуемых показателей у больных саркоидозом было снижено относительно группы контроля, к их числу относились абсолютные значения Вm1, IgD⁺CD38⁻ В-лимфоцитов, eВm5, IgD⁻CD38⁺ В-лимфоцитов и Вm5, IgD⁻CD38⁻, в то время как число Вm2⁺ клеток с фенотипом IgD⁺CD38⁺⁺ было достоверно повышено относительно здоровых лиц (табл. 2).

Таким образом, в целом по группе обследуемых больных с первично-хроническим течением саркоидоза, до начала применения иммуносупрессивной терапии, отмечается выраженная анергия В-клеточного звена иммунитета. Полученные данные могут свидетельствовать о компартментализации В-звена иммунного ответа с преобладанием клеток в очагах поражения и с выраженной анергией на периферии.

Повышенное число В-лимфоцитов с фенотипом IgD⁻CD38⁺⁺, представляющих собой общую субпопуляцию centroбластов и centroцитов (Вm3+Вm4 клетки) (IgD⁻CD38⁺⁺), также подтверждают эту гипотезу. Как известно, такие же закономерности перераспределения клеток в пораженные ткани из периферической крови отмечаются и для Т-лимфоцитов у больных саркоидозом, при этом на периферии отмечается выраженная анергия Т-звена.

Данные анализа субпопуляций В-лимфоцитов крови в группах больных саркоидозом с разной степенью активности заболевания представлены в таблице 3. Оказалось, что абсолютные значения большинства исследуемых субпопуляций В-лимфоцитов (активированных наивных

В-лимфоцитов (Вm2), клеток-предшественников В-лимфоцитов зародышевых центров периферических лимфоидных органов (Вm2'), а также двойных негативных Вm5) при более активном патологическом процессе (у больных II подгруппы) достоверно выше по сравнению с первой группой больных с менее активным воспалительным процессом.

Эти выводы согласуются также с полученными данными о достоверном снижении числа Вm1-наивных клеток, а также Вm5-покоящихся В-клеток памяти в периферической крови больных с более активно протекающим заболеванием (II подгруппа) по сравнению с первой подгруппой пациентов с признаками менее активного воспаления (табл. 3).

Таким образом, полученные данные указывают на активное участие В-лимфоцитов в патогенезе саркоидоза, поскольку при активации воспаления отмечается выраженная активация и В-звена иммунитета, а по мере прогрессирования заболевания снижается число наивных В-лимфоцитов и покоящихся В-клеток памяти в крови.

При использовании метода оценки распределения субпопуляций В-лимфоцитов с помощью маркеров IgD и CD27 получены данные, представленные в таблицах 4 и 5.

В целом по группе обследованных больных саркоидозом ($n = 41$), по сравнению с группой здоровых ($n = 43$) установлено повышенное содержание относительного числа наивных В-лимфоцитов, а также повышенное количество В-лимфоцитов памяти, переключивших изотип иммуноглобулинов и двойных негативных В-лимфоцитов памяти (табл. 4).

Данные о снижении числа В-лимфоцитов совпадают с полученными результатами при использовании классификации "Вm1-Вm5" и указывают, что в целом по группе обследуемых больных с первично-хроническим течением саркоидоза, до начала применения иммуносуперессивной терапии, отмечается анергия В-клеточного звена иммунитета. Обращает на себя внимание достоверное снижение процента В-лимфоцитов памяти, не переключивших изотип иммуноглобулинов (IgD⁺CD27⁺) и В-лимфоцитов памяти, переключивших изотип (IgD⁺CD27⁺) в периферической крови у обследованных больных саркоидозом II подгруппы по сравнению с больными I подгруппы с менее активным воспалительным процессом (табл. 5). Полученные результаты косвенно могут свидетельствовать о перераспределении субпопуляций В-лимфоцитов памяти из периферической крови в очаги воспаления и также указывают на роль В-звена иммунитета в патогенезе саркоидоза

При использовании оценки коэкспрессии молекул IgD и CD27 для характеристики субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови у больных саркоидозом, при подсчете абсолютного числа клеток, достоверных различий между группами больных саркоидозом выявлено не было, в отличие от ранее полученных данных при использовании маркеров "Вm1-Вm5" (табл. 3, 5).

По-видимому, определение субпопуляций В-лимфоцитов крови с помощью классификации маркеров "Вm1-Вm5" является более информативным по сравнению с определением коэкспрессии молекул IgD и CD27 для обследованных групп больных с хроническим течением саркоидоза при разной степени активности заболевания.

При анализе данных литературы отмечены совпадения с нашими данными. Так, Lee N.S. и соавт. отметили выраженное снижение числа CD27⁺В-клеток памяти у пациентов с тяжелым течением хронического саркоидоза и В-клеточную лимфопению [31]. Изменения в составе В-лимфоцитов периферической крови на разных стадиях дифференцировки и сниженное число В-клеток памяти у пациентов с активным хроническим саркоидозом описаны и другими авторами [41]. Повышенное число активированных наивных В-лимфоцитов с фенотипом IgD⁺CD38⁺, сравнительно недавно получивших сигнал активации от В-клеточного рецептора в крови больных саркоидозом, позволяет выдвинуть гипотезу о том, что антигены, вызывающие активацию В-лимфоцитов, постоянно персистируют в организме у таких больных. К числу этиологически значимых антигенов при саркоидозе могут относиться фрагменты внутриклеточно паразитирующих микроорганизмов, например *P. acnes* или ряда других.

Анализ взаимосвязи между числом определяемых субпопуляций В-лимфоцитов и уровнем АПФ в крови больных саркоидозом также подтвердил информативность предложенного в данной работе подхода к разделению больных на две группы — с менее активным (подгруппа I) и более активным (подгруппа II) воспалительным процессом.

Установлены достоверные зависимости между числом клеток, принадлежащих к разным субпопуляциям В-лимфоцитов крови, и значениями активности АПФ (рис. 1-2):

— обратная зависимость, $r = -0,557$ при $p < 0,001$, между относительным числом наивных Вm1-клеток (IgD⁺CD38⁻) и уровнем АПФ (рис. 1А);

— прямая зависимость, $r = 0,532$ при $p < 0,001$, между относительным числом наивных клеток с фенотипом IgD^+CD27^- и уровнем АПФ (рис. 2А);

— обратная зависимость, $r = -0,565$ при $p < 0,001$, между относительным числом В-клеток памяти, не переключивших класс синтезируемых антител (IgD^+CD27^+), и уровнем АПФ (рис. 2В).

Данных о сравнении субпопуляционного состава В-лимфоцитов в сопоставлении с активностью саркоидоза в современной литературе крайне мало.

В исследовании Ando M. и соавт. проводится сравнение ряда лабораторных маркеров с активностью и тяжестью течения саркоидоза. Отмечается, что уровень BAFF (B-cell activating factor) в сыворотке крови достоверно коррелирует с активностью саркоидоза, тяжестью заболевания и уровнем АПФ как одним из лабораторных маркеров активности заболевания [5, 7, 44]. Активирующий фактор BAFF относится к TNF-семейству и необходим для развития и нормального функционирования В-лимфоцитов. Он играет важную роль в выживании, дифференцировке клеток и дальнейшей продукции антител. В экспериментальных работах показано, что чрезмерная экспрессия BAFF приводит к активации В- и Т-лимфоцитов, гипергаммаглобулинемии и отложению иммунных комплексов [42]. Блокировка передачи сигнала от сывороточного BAFF на В-клетки при помощи таргетной терапии с применением моноклональных антител к рецептору BAFF (анти-BAFF-R mAb) резко снижает число В-лимфоцитов как фолликулярных, так и маргинальной зоны *in vivo* [39]. Следует отметить, что определение уровня BAFF в крови больных саркоидозом не является рутинным исследованием.

К числу новых лабораторных маркеров активности саркоидоза также относятся растворимый рецептор интерлейкина-2 (sIL-2), хитотриозидаза, сывороточный амилоид А, однако показано, что именно АПФ является по-прежнему наиболее информативным для оценки активности саркоидоза, поскольку его уровни коррелируют с клиническими критериями — проявлениями системности и нарастанием изменений на МСКТ [19, 27, 36, 45].

Изучение особенностей активации гуморального звена иммунитета может способствовать не только более полному пониманию механизмов иммунопатогенеза саркоидоза и роли В-лимфоцитов, но, возможно, со временем будет служить обоснованием для выработки критериев назначения таргетной иммунотерапии.

Таргетная терапия достаточно в редких случаях применяется при лечении саркоидоза и в основном “of label”. Поскольку известно, что Т-механизмы гиперчувствительности, наряду с

активацией В-звена иммунитета, играют важнейшую роль в патогенезе саркоидоза, ряд авторов указывают на необходимость использования в терапии саркоидоза препаратов, обеспечивающих снижение гиперактивных Т-клеточных ответов. Известно, что в процессе гранулемообразования при саркоидозе гиперактивированные интерфероном гамма и фактором некроза опухоли-альфа макрофаги сливаются в гигантские клетки воспаления, в этой связи препарат инфликсимаб, представляющий собой моноклональные антитела к фактору некроза опухоли, мог бы существенно снизить активность гиперчувствительных Т-клеточных иммунных ответов в пораженных тканях у больных саркоидозом.

В последние годы появились работы, свидетельствующие о благоприятном таргетном воздействии и на В-лимфоциты при ряде заболеваний. Терапия с помощью анти-CD20 моноклональных антител приводит к положительному клиническому эффекту при таких классических аутоиммунных заболеваниях, как системная красная волчанка и ревматоидный артрит. Показан также положительный клинический эффект такой терапии при тяжелых формах саркоидоза, нейросаркоидозе, саркоидозе с поражением глаз, сердца [6, 9, 11, 16, 18, 30]. Эти данные успешной таргетной иммунотерапии больных саркоидозом с использованием анти-CD20 моноклональных антител (препарат ритуксимаб) подтверждают важную патогенетическую роль гуморальных механизмов при хроническом течении заболевания с проявлениями системности поражений.

Belkhou A. и соавт. описали случай применения ритуксимаба в качестве альтернативного лечения больной саркоидозом при неэффективности применения системных кортикостероидов. Авторы описывают улучшение клинического состояния пациентки: снижение интенсивности суставных проявлений, снижение астении, нормализацию легочных функциональных тестов [9].

Другая группа авторов описала случай применения ритуксимаба (анти-CD20) после отмены проведенной терапии метотрексатом и инфликсимабом (анти-TNF α) у пациентки с саркоидозом с поражением легочных, медиастинальных, брыжеечных, перитонеальных лимфатических узлов и высокой активностью АПФ. Отмечалось улучшение состояния больной, нормализация уровня АПФ, уменьшение размеров легочных и перитонеальных лимфатических узлов [18]. Cinetto F. и соавт. отмечают снижение прогрессирования поражения легких при хроническом рефрактерном саркоидозе и возможности отмены системных кортикостероидов с течением времени [16]. У больных нейросаркоидозом ритукси-

маб может быть рекомендован при устойчивости к кортикостероидам и другим обычно используемым методам супрессивной иммунотерапии [11]. Применение ритуксимаба также показано при саркоидозе с поражением глаз в качестве альтернативного подхода, при резистентности к другим методам лечения или при наличии противопоказаний к терапии кортикостероидами [6].

В заключение следует отметить, что полученные данные свидетельствуют о важной роли В-клеточного иммунного ответа в патогенезе

саркоидоза и дают возможность оценить особенности гуморального ответа при разной степени активности заболевания.

В дальнейшем необходимы более углубленные клиничко-иммунологические сопоставления, основанные на многофакторном анализе показателей активности заболевания с целью разработки возможных клиничко-иммунологических критериев оценки эффективности терапии саркоидоза и своевременной ее коррекции, возможно, с использованием таргетной иммунотерапии.

Список литературы / References

1. Айсанов З.Р., Амиров Н.Б., Баранова О.П., Визель А.А., Визель И.Ю., Гурyleва М.Э., Фаткуллин И.Ф., Чучалин А.Г. Саркоидоз. М.: Атмосфера, 2010. 416 с. [Aisanov Z.R., Amirov N.B., Baranova O.P., Vizel A.A., Vizel I.Yu., Gurileva M.E., Fatkullin I.F., Chuchalin A.G. Sarcoidosis]. Moscow: Atmosphaera, 2010. 416 p.
2. Акопов А.Л., Баранова О.П., Богданов А.Н., Бондаренко И.Б., Двораковская И.В., Илькович М.М., Илькович Ю.М., Лучкевич В.С., Новикова Л.Н., Орлова Г.П., Орлов С.В. Интерстициальные и орфанные заболевания легких. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 560 с. [Akopov A.L., Baranova O.P., Bogdanov A.N., Bondarenko I.B., Dvorakovskaya I.V., Ilkovich M.M., Ilkovich Yu.M., Luchkevich V.S., Novikova L.N., Orlova G.P., Orlov S.V. Interstitial and orphan lung diseases]. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 560 p.
3. Будкова А.И., Лапин С.В., Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Тришина И.Н., Маслянский А.Л., Тотолян А.А. Субпопуляционный состав В-клеток периферической крови у больных системной красной волчанкой // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 175-184. [Budkova A.I., Lapin S.V., Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Trishina I.N., Maslyansky A.L., Totolian A.A. B-cell subpopulations of peripheral blood in systemic lupus erythematosus. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 175-184. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184.
4. 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.
5. Ando M., Goto A., Takeno Y., Yamasue M., Komiya K., Umeki K., Nureki S.I., Miyazaki E., Kadota J.I. Significant elevation of the levels of B-cell activating factor (BAFF) in patients with sarcoidosis. *Clin. Rheumatol.*, 2018, Vol. 37, no. 10, pp. 2833-2838.
6. Beccastrini E., Vannozzi L., Bacherini D., Squatrito D., Emmi L. Successful treatment of ocular sarcoidosis with rituximab. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, 2013, Vol. 21, no. 3, pp. 244-246.
7. Beijer E., Velthkamp M., Meek B., Moller D.R. Etiology and immunopathogenesis of sarcoidosis: Novel insights. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 2017, Vol. 38, no. 4, pp. 404-416.
8. Belhomme N., Jouneau S., Bouzillat G., Decaux O., Lederlin M., Guillot S., Perlat A., Jégo P. Role of serum immunoglobulins for predicting sarcoidosis outcome: A cohort study. *PLoS ONE*, 2018, Vol. 13, no. 4, e0193122. doi: 10.1371/journal.pone.0193122.
9. Belkhou A., Younsi R., Bouchti I., Hassani S. Rituximab as a treatment alternative in sarcoidosis. *Joint Bone Spine*, 2008, Vol. 75, pp. 511-512.
10. Bernstein K.E., Ong F.S., Blackwell W.L., Shah K.H., Giani J.F., Gonzalez-Villalobos R.A., Shen X.Z., Fuchs S., Touyz R.M. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. *Pharmacol. Rev.*, 2012, Vol. 65, pp. 1-46.
11. Bompreszi R., Pati S., Chansakul C., Vollmer T. A case of neurosarcoidosis successfully treated with rituximab. *Neurology*, 2010, Vol. 75, pp. 568-570.
12. 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.
13. Cannon R.O., Cunnion R.E., Parrillo J.E., Palmeri S.T., Tucker E.E., Schenke W.H., Epstein S.E. Dynamic limitation of coronary vasodilator reserve in patients with dilated cardiomyopathy and chest pain. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1987, Vol. 10, pp. 190-200.
14. Casanova N., Zhou T., Knox K.S., Garcia J.G. Identifying novel biomarkers in sarcoidosis using genome-based approaches. *Clin. Chest Med.*, 2015, Vol. 36, pp. 621-630.

15. Chopra A., Kalkanis A., Judson M.A. Biomarkers in sarcoidosis. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 12, pp. 1191-1208.
16. Cinetto F., Compagno N., Scarpa R., Malipiero G., Agostini C. Rituximab in refractory sarcoidosis: a single centre experience. *Clin. Mol. Allergy*, 2015, Vol. 13, no. 1, p. 19.
17. Csongrádi A., Enyedi A., Takács I., Végh T., Mányiné I.S., Pólik Z., Altörjay I.T., Balla J., Balla G., Édes I., Kappelmayer J., Tóth A., Papp Z., Fagyas M. Optimized angiotensin-converting enzyme activity assay for the accurate diagnosis of sarcoidosis. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2018, Vol. 56, no. 7, pp. 1117-1125.
18. Dasilva V., Breuil V., Chevallier P., Euller-Ziegler L. Relapse of severe sarcoidosis with an uncommon peritoneal location after TNFalpha blockade. Efficacy of rituximab, report of a single case. *Joint Bone Spine*, 2010, Vol. 77, pp. 82-83.
19. Duan J., Xu Y., Zhu H., Zhang H., Sun S., Sun H., Wang W., Xie S. Relationship between CT activity score with lung function and the serum angiotensin converting enzyme in pulmonary sarcoidosis on chest HRCT. *Medicine (Baltimore)*, 2018, Vol. 97, no. 36, e12205. doi: 10.1097/MD.00000000000012205.
20. Georas S.N., Chapman T.J., Crouser E.D. Sarcoidosis and T-helper cells. Th1, Th17, or Th17.1? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, Vol. 193, no. 11, pp. 1198-200.
21. Grosso S., Margollicci M.A., Bargagli E., Buccoliero Q.R., Perrone A., Galimberti D., Morgese G., Balestri P., Rottoli P. Serum levels of chitotriosidase as a marker of disease activity and clinical stage in sarcoidosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2004, Vol. 64, pp. 57-62.
22. Grutters J.C., Fellrath J.-M., Mulder L., Janssen R., van den Bosch J.M., van Velzen-Blad H. Serum soluble interleukin-2 receptor measurement in patients with sarcoidosis: a clinical evaluation. *Chest*, 2003, Vol. 124, no. 1, pp. 186-195.
23. Häggmark A., Hamsten C., Wiklundh E., Lindskog C., Mattsson C., Andersson E., Lundberg I.E., Grönlund H., Schwenk J.M., Eklund A., Grunewald J., Nilsson P. Proteomic profiling reveals autoimmune targets in sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2015, Vol. 191, no. 5, pp. 574-583.
24. 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.
25. Hunninghake G.W., Crystal R.G. Mechanisms of hypergammaglobulinemia in pulmonary sarcoidosis. Site of increased antibody production and role of T lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 1981, Vol. 67, no. 1, pp. 86-92.
26. Janiak P., Libert O., Vilaine J.P. Role of the renin-angiotensin system in neointima formation after injury in rabbits. *Hypertension*, 1994, Vol. 24, pp. 671-678.
27. Kahkouee S., Samadi K., Alai A., Abedini A., Rezaiian L. Serum ACE level in sarcoidosis patients with typical and atypical HRCT manifestation. *Pol. J. Radiol.*, 2016, Vol. 81, pp. 458-461.
28. Kobak S., Yilmaz H., Sever F., Duran A., Sen N., Karaarslan A. The prevalence of antinuclear antibodies in patients with sarcoidosis. *Autoimmune Dis.*, 2014, Vol. 2014, 351852. doi: 10.1155/2014/351852.
29. Kobak S., Yilmaz H., Sever F., Duran A., Sen N. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.*, 2014, Vol. 31, no. 3, pp. 206-210.
30. Krause M.L., Cooper L.T., Chareonthaitawee P., Amin S. Successful use of rituximab in refractory cardiac sarcoidosis. *Rheumatology (Oxford)*, 2016, Vol. 55, no. 1, pp. 189-191.
31. Lee N.S., Barber L., Akula S.M., Sigounas G., Kataria Y.P., Arce S. Disturbed homeostasis and multiple signaling defects in the peripheral blood B-cell compartment of patients with severe chronic sarcoidosis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011, Vol. 18, no. 8, pp. 1306-1316.
32. Liu Y., Qiu L., Wang Y., Aimuro 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.
33. Mathur R.S., Kurdikar V.L., Shah J.R. Serum angiotensin converting enzyme in the diagnosis of pulmonary sarcoidosis. *J. Assoc. Physicians India*, 1990, Vol. 38, pp. 474-475.
34. Miedema J.R., Kaiser Y., Broos C.E., Wijzenbeek M.S., Grunewald J., Kool M. Th17-lineage cells in pulmonary sarcoidosis and Löfgren's syndrome: Friend or foe? *J. Autoimmun.*, 2018, Vol. 87, pp. 82-96.
35. O'Reilly P.J., Ding Q., Akthar S., Cai G., Genschmer K.R., Patel D.F., Jackson P.L., Viera L., Roda M., Locy M.L., Bernstein E.A., Lloyd C.M., Bernstein K.E., Snelgrove R.J., Blalock J.E. Angiotensin-converting enzyme defines matrikine-regulated inflammation and fibrosis. *JCI Insight*, 2017, Vol. 2, no. 22, 91923. doi: 10.1172/jci.insight.91923.
36. Ors F., Gumus S., Aydogan M., Sari S., Verim S., Deniz O. HRCT findings of pulmonary sarcoidosis; relation to pulmonary function tests. *Multidiscip. Respir. Med.*, 2013, Vol. 8, p. 8.
37. Palchevskiy V., Hashemi N., Weigt S.S., Xue Y.Y., Derhovanessian A., Keane M.P., Strieter R.M., Fishbein M.C., Deng J.C., Lynch J.P., Elashoff R., Belperio J.A. Immune response CC chemokines CCL2 and CCL5 are associated with pulmonary sarcoidosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011, Vol. 4, p. 10.
38. Popević S., Šumarac Z., Jovanović D., Babić D., Stjepanović M., Jovičić S., Šobić-Šaranović D., Filipović S., Gvozdenović B., Omčikus M., Milovanović A., Videnović-Ivanov J., Radović A., Žugić V., Mihailović-Vučinić V. Verifying sarcoidosis activity: chitotriosidase versus ace in sarcoidosis – case-control study. *J. Med. Biochem*, 2016, Vol. 35, pp. 390-400.
39. Rauch M., Tussiwand R., Bosco N., Rolink A.G. Crucial role for BAFF-BAFF-R signaling in the survival and maintenance of mature B cells. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, e5456. doi: 10.1371/journal.pone.0005456.

40. Sakthivel P, Bruder D. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2017, Vol. 24, no. 1, pp. 59-65.
41. Saussine A., Tazi A., Feuillet S., Rybojad M., Juillard C., Bergeron A., Dessirier V., Bouhidel F., Janin A., Bensussan A., Bagot M., Bouaziz J.D. Active chronic sarcoidosis is characterized by increased transitional blood B cells, increased IL-10-producing regulatory B cells and high BAFF levels. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 8, 43588. doi: 10.1371/journal.pone.0043588.
42. Stohl W., Xu D., Kim K.S., Koss M.N., Jorgensen T.N., Deocharan B., Metzger T.E., Bixler S.A., Hong Y.S., Ambrose C.M., Mackay F., Morel L., Putterman C., Kotzin B.L., Kallied S.L. BAFF overexpression and accelerated glomerular disease in mice with an incomplete genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 2005, Vol. 52, pp. 2080-2091.
43. Ten Berge B., Paats M.S., Bergen I.M., van den Blink B., Hoogsteden H.C., Lambrecht B.N., Hendriks R.W., Kleinjan A. Increased IL-17A expression in granulomas and in circulating memory T cells in sarcoidosis. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, Vol. 51, no. 1, pp. 37-46.
44. Ueda-Hayakawa I., Tanimura H., Osawa M., Iwasaka H., Ohe S., Yamazaki F., Mizuno K., Okamoto H. Elevated serum BAFF levels in patients with sarcoidosis: association with disease activity. *Rheumatology (Oxford)*, 2013, Vol. 52, no. 9, pp. 1658-1666.
45. Vorselaars A.D., van Moersel C.H., Zanen P., Ruven H.J., Claessen A.M., van Velzen-Blad H., Grutters J.C. ACE and sIL-2R correlate with lung function improvement in sarcoidosis during methotrexate therapy. *Respir. Med.*, 2015, Vol. 109, pp. 279-285.
46. Weinberg I., Vasiliev L., Gotsman I. Anti-dsDNA antibodies in sarcoidosis. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2000, Vol. 29, no. 5, pp. 328-331.
47. Weir E.K. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest*, 1982, Vol. 82, pp. 519-521.

Авторы:

Лазарева Н.М. — старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения; старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Баранова О.П. — к.м.н., старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт интерстициальных и орфанных заболеваний легких, доцент кафедры пульмонологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Серебрякова М.К. — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Бажанов А.А. — врач, Научно-исследовательский институт хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, 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

Authors:

Lazareva N.M., Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Associate 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

Baranova O.P., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Interstitial and Orphan Diseases, Associate Professor, Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Serebriakova M.K., Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Bazhanov A.A., Doctor, Research Institute of Surgery and Emergency Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Ses' T.P., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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; заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

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; Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 31.10.2019
Отправлена на доработку 20.11.2019
Принята к печати 28.11.2019

Received 31.10.2019
Revision received 20.11.2019
Accepted 28.11.2019

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ И ИММУННЫЙ ОТВЕТ У БОЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫМ ФИБРОЗНО- КАВЕРНОЗНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ С РАЗЛИЧНОЙ РАСПРОСТРАНЕННОСТЬЮ ДЕСТРУКТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ

Кноринг Б.Е.¹, Давыдова Н.И.², Аветисян А.О.¹, Яблонский П.К.^{1,3}

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

² ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. В основе многих иммунопатологических процессов при туберкулезе лежат нарушения программируемой клеточной гибели. Особый интерес представляет взаимосвязь активности апоптоза с выраженностью иммунного ответа у больных фиброзно-кавернозным лекарственно-устойчивым туберкулезом легких при различной распространенности процесса. В работе проанализированы показатели апоптоза, пролиферативной активности лимфоцитов, продукции цитокинов и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных с одно- и двусторонним фиброзно-кавернозным лекарственно-устойчивым туберкулезом легких. Показано, что активность апоптоза у обследованных больных тесно коррелирует с распространенностью процесса. Выраженность раннего и позднего апоптоза и, как следствие, количества живых клеток отражает степень прогрессирования деструктивного процесса в легких при фиброзно-кавернозном туберкулезе. Установлена возможность прогнозирования распространенности деструктивных изменений в легких на основе выраженности маркеров апоптоза. Клинически значимыми оказались показатели активности раннего апоптоза Т-лимфоцитов, превышающие норму на 25% и выше. Выявлена отчетливая взаимосвязь показателей иммунного ответа с уровнем апоптоза. При этом показана неоднозначность в изменении ряда иммунологических параметров при усилении апоптоза лимфоцитов, сопряженная с выраженностью деструктивных изменений. Повышение апоптотической гибели клеток у всех больных фиброзно-кавернозным туберкулезом, независимо от распространенности процесса, ассоциировалось с угнетением антигенспецифического пролиферативного ответа, снижением уровня CD25⁺ лимфоцитов, повышением числа В-клеток, наряду со снижением продукции IFN γ , IL-8, и повышением IL-2 в ответ на RPD. При односторонней деструкции увеличение активности апоптоза сопровождалось снижением количества CD95⁺ клеток, уменьшением продукции TNF α ; при двусторонней деструкции, напротив,

Адрес для переписки:

Кноринг Беатриса Ефимовна
ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ
191036, Россия, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2-4.
Тел.: 8 (812) 775-75-55.
E-mail: sdknor@mail.ru

Address for correspondence:

Knoring Beatrice E.
St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology
191036, Russian Federation, St. Petersburg,
Ligovsky ave., 2-4.
Phone: 7 (812) 775-75-55.
E-mail: sdknor@mail.ru

Образец цитирования:

Б.Е. Кноринг, Н.И. Давыдова, А.О. Аветисян, П.К. Яблонский «Апоптоз лимфоцитов и иммунный ответ у больных лекарственно-устойчивым фиброзно-кавернозным туберкулезом с различной распространенностью деструктивных изменений в легких» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1099-1114.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1099-1114

© Кноринг Б.Е. и соавт., 2019

For citation:

B.E. Knoring, N.I. Davydova, A.O. Avetisyan, P.K. Yablonsky "Lymphocyte apoptosis and immune response in patients with drug-resistant fibro-cavernous tuberculosis with different prevalence of destructive changes in the lungs", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1099-1114.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1099-1114

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1099-1114

отличалось высоким содержанием CD95⁺ лимфоцитов, увеличением выработки TNF α и IL-10. Показателем крайне неблагоприятного течения процесса является сочетание высокого уровня апоптоза и низкого антиген-специфического ответа с низкой экспрессией CD25⁺ клеток, повышенным числом CD19⁺ и CD95⁺ лимфоцитов, снижением продукции IFN γ , IL-8 и увеличением выработки IL-2, TNF α , IL-10. Установленные в работе закономерности свидетельствуют, что комплексный учет показателей апоптоза совместно с иммунологическими параметрами обладает более высокой информативностью при оценке состояния иммунокомпетентных клеток, характера процесса и тенденций его развития. Выявление особенностей программируемой гибели лимфоцитов в совокупности с параметрами иммунитета позволит оценить роль апоптоза в каждом отдельном случае и прогнозировать течение процесса, с последующим обоснованием целесообразности назначения иммунотерапии.

Ключевые слова: туберкулез легких, апоптоз лимфоцитов, иммунный ответ

LYMPHOCYTE APOPTOSIS AND IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH DRUG-RESISTANT FIBRO-CAVERNOUS TUBERCULOSIS WITH DIFFERENT PREVALENCE OF DESTRUCTIVE CHANGES IN THE LUNGS

Knoring B.E.^a, Davydova N.I.^b, Avetisyan A.O.^a, Yablonsky P.K.^{a,c}

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

^b A. Nikiforov Russian Center for Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Disturbances of programmed cell death are at the heart of many immunopathological processes in tuberculosis. The relationship between activity of apoptosis and severity of immune response is of particular interest in the patients with fibrous-cavernous drug-resistant pulmonary tuberculosis at different extent of the process. The paper concerns features of apoptosis, proliferative activity of lymphocytes, cytokine's production and subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in the patients with uni- and bilateral fibrous-cavernous drug-resistant pulmonary tuberculosis. It was shown that apoptotic rates in the examined patients is closely related to extent of pathological process. Extent of early and late apoptosis and, accordingly, the number of living cells reflected the progression degree of destructive process in the lungs affected by fibrous-cavernous tuberculosis. The possibility of predicting the extent of destructive changes in affected lungs based on expression of apoptosis markers is presumed. Index of activity for early apoptosis of T lymphocytes, exceeding normal values by 25% and higher were clinically significant. A clear relationship between the immune response and apoptosis level was revealed. Ambiguous changes of immunological parameters were shown with increasing apoptosis associated with the severity of destructive changes. Increased apoptotic cell death in all patients with fibrous-cavernous tuberculosis, regardless of extent of the process, was associated with inhibition of antigen-specific proliferative response, decrease in CD25⁺ lymphocytes, increased numbers of B cells, along with decreased production of IFN γ , IL-8, and increased IL-2 response to PPD. In cases of unilateral destruction, increased apoptotic rates were accompanied by a decrease in the CD95⁺ cell numbers, and a decrease in TNF α production. On the contrary, in patients with bilateral destruction it was characterized by a high content of CD95⁺ lymphocytes, increased production of TNF α and IL-10. An index of extremely unfavorable course of the process is a combination of high apoptosis levels and low antigen-specific response with low expression of CD25⁺ cells, increased number of CD19⁺ and CD95⁺ lymphocytes, decreased production of IFN γ , IL-8 and increased production of IL-2, TNF α , IL-10. The relationships found in the work indicate that the combined assessment of apoptosis indexes, together with immunological parameters, has a higher informative value when assessing the state of immunocompetent cells, the origin of the process and trends for its development. Detecting the features of programmed lymphocyte death, in conjunction with immune parameters, allows to evaluate the role of apoptosis in each single case and to predict the course of the process, with subsequent justification of immunotherapy administration.

Keywords: pulmonary tuberculosis, apoptosis, lymphocytes, immune response

Введение

Широкое распространение туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью приводит к развитию тяжелого, прогрессирующего течения туберкулезного процесса, характеризующегося быстрой генерализацией воспаления, снижением иммунитета и отсутствием эффекта от проводимой химиотерапии [3, 15, 38, 39, 49, 55]. Установлено, что в основе многих иммунопатологических процессов при туберкулезе лежат нарушения программируемой клеточной гибели — апоптоза, основные функции которого заключаются в поддержании клеточного гомеостаза, уничтожении и элиминации собственных дефектных клеток. Взаимодействие микобактерий с клетками организма человека направлено на разрушение клеток, в том числе апоптозом [5, 25, 31, 37, 41, 55]. Как подавление, так и усиление апоптоза может привести к прогрессированию туберкулезного процесса. Усиление процесса апоптоза лимфоцитов является основной причиной иммуносупрессии при неуклонно прогрессирующих деструктивных формах туберкулеза [5, 41, 51]. Известно, что *M. tuberculosis* (МТБ), используя антиапоптотические механизмы, с одной стороны, подавляют апоптоз макрофагов, являющийся защитным механизмом при туберкулезе, с другой — стимулируют избыточный апоптоз активированных Т-лимфоцитов путем их повторной активации антигенами вирулентных микобактерий. Чем более вирулентен штамм МТБ, тем выше его ингибирующее действие на апоптоз макрофагов и индуцирующее на апоптоз лимфоцитов. При этом скорость апоптоза возрастает соответственно уменьшению числа пролиферирующих лимфоидных клеток. Значительная элиминация лимфоцитов сопряжена с развитием иммунодефицитных состояний [25, 51]. Наряду с этим длительно протекающий процесс апоптоза в очаге воспаления может привести к формированию фиброза, что связывают со способностью макрофагов, фагоцитировавших апоптотические клетки, особенно у PPD-анергичных больных, секретировать иммуносупрессорные IL-10, TGF- β и другие ростовые факторы [7, 12, 28, 33].

Активация апоптоза лимфоцитов на фоне угнетения их пролиферативной активности отмечается у больных с осложненным течением процесса с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* и иммунной недостаточностью [21]. Ингибция апоптоза макрофагов приводит к снижению иммунного распознавания МБТ и дальнейшему инфицированию близлежащих клеток организма больного. С подавлением апоптоза инфицированных клеток связывают появление лекарственно-устойчивых форм возбудителя туберкулеза [1, 7, 31]. То есть дисбаланс про- и антиапоптоген-

ных механизмов при лекарственно-устойчивом фиброзно-кавернозном туберкулезе (ЛУ-ФКТ) может предопределить течение и исход патологического процесса [14, 17, 18, 30, 41].

Регулирующее действие на апоптоз, как стимулирующее, так и ингибирующее, оказывают многие цитокины [6, 8, 18, 32, 34, 42, 48, 53]. Цитокины, продуцируемые Th1 (IL-2, IL-12, IFN γ) могут предотвращать апоптоз Т-клеток *in vitro* [32, 42, 53]. В то же время цитокины, продуцируемые Th2 (IL-4 и IL-10), а также TNF α могут усиливать апоптоз [10, 48, 54]. Наряду с этим указывается на возможность их альтернативного действия [6-8]. В зависимости от типа цитокина, их концентрации, функционального состояния клетки, цитокины выступают в роли индуктора или ингибитора апоптоза. Данные литературы свидетельствуют и о дозозависимом действии цитокинов [8, 14, 44]. Одновременно цитокины влияют на процессы аутофагии бактерий и их переваривание в фаголизосомах. IFN γ и TNF α стимулируют аутофагию, IL-4 и IL-13, напротив, снижают образование фаголизосом и повышают внутриклеточное выживание *M. tuberculosis* [7, 33]. Туберкулезный процесс чаще всего сопровождается угнетением продукции IFN γ и IL-2, обладающих защитным действием от апоптоза [9, 50]. В работах [45, 47, 48] показано, что TNF α и IL-10 регулируют тип гибели клеток, возникающий в ответ на *M. tuberculosis*. Ингибирование IL-8 повышало регуляцию экспрессии апоптотических факторов при одновременном подавлении антиапоптотических [26, 40].

В настоящее время детальное изучение механизмов, определяющих неблагоприятное течение туберкулезного процесса, является одной из основных задач в клинике фтизиатрии. Показана взаимосвязь выраженности апоптоза с различными формами туберкулеза и лекарственной чувствительностью возбудителя [20, 21, 41]. Особый интерес представляет изучение особенностей клеточной гибели у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом (ФКТ) в связи с имеющимися в литературе расхождениями о степени интенсивности апоптоза при этой патологии [16, 20].

Дальнейшее углубленное выявление взаимосвязей в системе апоптоза и иммунного ответа у больных прогрессирующим ЛУ-ФКТ, отличающихся по распространенности деструктивных изменений в легких, представляется важным для оценки характера нарушений иммунитета, прогнозирования течения и исхода патологического процесса и обоснования целесообразности проведения иммунотерапии. Определение степени интенсивности апоптоза может иметь и диагностическое значение, способствуя своевременно-

му выявлению дисбаланса между про- и анти-апоптозными механизмами программируемой гибели клеток.

Цель работы — поиск новых критериев для оценки характера процесса, его направленности и исхода на основе комплексного анализа изменений показателей апоптоза лимфоцитов и параметров иммунного ответа у больных лекарственно-устойчивым ФКТ, отличающихся по распространенности процесса.

Материалы и методы

В исследование были включены 70 больных прогрессирующим лекарственно-устойчивым ФКТ (ЛУ-ФКТ), проходивших лечение в Санкт-Петербургском НИИ фтизиопульмонологии. В число больных вошло 47 мужчин и 23 женщины. Возраст больных колебался от 19 до 63 лет. Диагноз «туберкулез» был верифицирован на основании клинической картины заболевания, рентгенологического и КТ-исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Во всех случаях

течение заболевания было хроническим, процесс был длительным (> 2 лет) и характеризовался значительной протяженностью легочного процесса, наличием распада легочной ткани с формированием каверн, очагов бронхогенного обсеменения, отсутствием положительной клинико-рентгенологической динамики или прогрессированием процесса в условиях интенсивной многомесячной полихимиотерапии. У пациентов определялось массивное бактериовыделение. Штаммы выделенных у больных микобактерий имели первичную или вторичную множественную (МЛУ) или широкую (ШЛУ) лекарственную устойчивость. Среди пациентов были выделены группы, отличающиеся по распространенности кавернозного процесса. Односторонний процесс в легких диагностирован у 43 человек, из которых у 11,6% выделены МБТ с ШЛУ, двусторонний процесс диагностирован у 27 человек, из них МБТ с ШЛУ выделены в 33,3% случаев.

Контрольную группу составили практически здоровые лица (23 человека) в возрасте от 19 до 45 лет, мужчин 11 (47,8%), женщин 12 (52,2%). Все

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ, СОДЕРЖАНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ И ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ЛУ-ФКТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЫРАЖЕННОСТИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕГКИХ (M±m)

TABLE 1. INDICATORS OF APOPTOSIS OF LYMPHOCYTES AND OF THE CONTENT OF LEUKOCYTES AND LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH DR-FCTB DEPENDING ON THE SEVERITY OF PATHOLOGICAL CHANGES IN THE LUNGS (M±m)

Параметры Parameters	Все больные ФКТ All patients with FCTB n = 70	Односторонний ФКТ Unilateral FCTB n = 43	Двусторонний ФКТ Bilateral FCTB n = 27	Здоровые Healthy n = 23
	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4
AN+PI- (%)	16,20±1,16*	13,60±0,17*	20,34±12,90* ■	11,40±0,83
AN+PI+ (%)	2,35±0,17	2,22±0,04	2,557±1,680	1,93±0,20
AN-PI- (%)	80,93±1,27*	83,542±0,200*	76,764±2,670* ■	87,70±1,04
Лимфоциты (%) Lymphocytes (%)	26,3±1,2*	24,97±1,82*	27,20±1,46*	32,8±1,2
Лимфоциты < 20, % Lymphocytes < 20, %	22,7*	32,4* ■	10,7*	0
Лимфоциты × 10 ⁹ /л Lymphocytes × 10 ⁹ /l	2,44±0,13	2,27±0,16	2,59±0,21	2,13±0,07
Лейкоциты × 10 ⁹ /л Leukocytes × 10 ⁹ /l	9,83±0,46	10,06±0,65*	9,64±0,59*	6,67±0,29
Лейкоциты > 10 × 10 ⁹ /л, % Leukocytes > 10 × 10 ⁹ /l, %	47*	43,6*	51,6*	0

Примечание. * – достоверные различия между больными (группы 1-3) и донорами (группа 4); * – между больными групп 2 и 3; * – между больными групп 1 и 3. p < 0,05.

Note. Results with significant difference in groups studied are marked as following: *, groups 1-3 and healthy (group 4); ■, groups 2 and 3; *, groups 1 and 3. p < 0.05.

обследованные лица были ВИЧ-отрицательны. Материалом для исследования служила венозная гепаринизированная кровь, полученная из локтевой вены. Мононуклеары из периферической крови (РВМС) выделяли при центрифугировании в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077$ г/мл) согласно инструкции. Уровень апоптоза Т-лимфоцитов определяли на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD, США) в программе Cell Quest. Применяли двойное окрашивание FITC Annexin V (AV) в сочетании с красителем иодид пропидия (PI) с использованием коммерческого набора BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, кат. № 556547 (BD Biosciences, США). Идентифицировали клетки в ранней стадии апоптоза (AN^+PI^-), в поздней стадии апоптоза (AN^+PI^+) и живые (интактные) клетки (AN^-PI^-). Концентрацию IL-2, IL-8, IL-10, TNF α и IFN γ определяли в супернатантах мононуклеаров, стимулированных PPD, методом иммуноферментного анализа на тест-системах производства АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) в соответствии с инструкциями производителя. Пролиферативную активность лимфоцитов крови в ответ на PPD изучали методом подсчета доли окрашенных пропидий йодидом клеток, находящихся в фазах клеточного цикла S и G2/M на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD, США) в программе CellQuest. Пролиферативный ответ считался положительным, если в ответ на PPD доля клеток, находящихся в S-фазе, была $\geq 5\%$. Определение субпопуляций лимфоцитов по маркерам клеточной дифференцировки ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, $CD19^+$, HLA-DR $^+$, $CD95^+$) проводили методом иммунофенотипирования с использованием моноклональных анти-

тел фирмы Becton Dickinson (США), меченных FITC (изотиоцианат флуоресцеина) и PE (фико-эритрин). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD, США) в программе SimulSet

Статистический анализ осуществлялся с помощью программы Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). Для оценки достоверности различий в выборках, соответствующих нормальному распределению, применяли t-критерий Стьюдента; при отклонении распределения от нормального использовали U-критерий Манна–Уитни. Различия считались достоверными при значении $p < 0,05$. Для оценки взаимосвязи между изучаемыми параметрами проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции по Спирмену (r). Корреляцию считали значимой при $p < 0,05$.

Результаты

Относительное содержание лимфоцитов периферической крови, апоптотических лимфоцитов, находящихся на ранней (AN^+PI^-) и поздней стадии апоптоза (AN^+PI^+), и содержание живых (интактных) клеток, не подвергшихся апоптозу (AN^-PI^-), у больных ЛУ-ФКТ и у здоровых лиц представлено в таблице 1. Относительное содержание лимфоцитов крови у всех больных ЛУ-ФКТ (группа 1) было снижено, чаще при одностороннем процессе (группа 2). Содержание лимфоцитов крови, находящихся на ранней стадии апоптоза, у больных достоверно превышало таковое у доноров, на поздней — не отличалось от контроля; количество интактных клеток у всех больных 1 группы было снижено. Отмечена прямая корреляционная связь числа апоптотических

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЕЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АПОПТОЗА У БОЛЬНЫХ ЛУ-ФКТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ДЕСТРУКТИВНОГО ПРОЦЕССА В ЛЕГКИХ (%)

TABLE 2. FREQUENCY OF DETECTION OF DIFFERENT LEVELS OF APOPTOSIS INDICATORS IN PATIENTS WITH DRUG-RESISTANT FCTB DEPENDING ON THE PREVALENCE OF DESTRUCTIVE PROCESS IN THE LUNGS (%)

Параметры Parameters	Число клеток Number of cells %	Все больные ФКТ All patients with FCTB n = 70	Односторонний ФКТ Unilateral FCTB n = 43	Двусторонний ФКТ Bilateral FCTB n = 27	Здоровые Healthy n = 23
		Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4
AN^+PI^-	> 17,5	34,3*	20,9* [■]	55,6* [■]	4,13
AN^+PI^-	> 25	11,43*	2,3*	25,9* [■]	0
AN^-PI^-	< 75	14,5*	4,7*	29,6* [■]	0
AN^+PI^+	$\geq 4,5$	10,14*	4,7	19*	0

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ В ОТВЕТ НА ППД У БОЛЬНЫХ ЛУ-ФКТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПРОЦЕССА И АКТИВНОСТИ АПОПТОЗА (ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ)

TABLE 3. PPD-INDUCED PROLIFERATIVE ACTIVITY OF THE LYMPHOCYTES FROM PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH DRUG-RESISTANT FCTB DEPENDING ON THE PREVALENCE OF PROCESS AND ACTIVITY OF APOPTOSIS (FREQUENCY OF DETECTION)

Показатели Parameters	Уровень Level	Больные ФКТ Группа 1 Patients with FCTB Group 1 n = 44		Односторонний ФКТ Группа 2 Unilateral FCTB Group 2 n = 29		Двусторонний ФКТ Группа 3 Bilateral FCTB Group 3 n = 15	
		Частота выявления лиц с показателями РБТЛ (%) Detection frequency of individuals with indicators RBTL (%)					
		< 5%	≥ 5%	< 5%	≥ 5%	< 5%	≥ 5%
AN+PI-	N	32 ^{•*}	68 [•]	38,9	61,10	14,3 [•]	85,7 [•]
AN+PI-	↑	68,4 ^{•*}	31,58 [•]	45,45	54,50	100 [•]	0 [•]
AN+PI-	N	33,3 [•]	70 ^{•*}	35 [•]	65 [•]	14,3 [•]	85,7 ^{•*}
AN+PI-	↓	78 [•]	21 ^{•*}	50	50	100 [•]	0 ^{•*}

Примечание. Уровни показателей AN⁺PI⁻ и AN⁺PI⁻ обозначены как: нормальный – N, повышенный – ↑, низкий – ↓. Достоверные различия между больными с показателями РБТЛ < 5% и ≥ 5% обозначены: • – в группе 1, * – в группе 2, * – в группе 3; между больными с N и ↑ показателями AN⁺PI⁻: * – в группе 1; между больными с N и ↓ показателями AN⁺PI⁻: * – в группе 1, * – в группе 3. p < 0,05.

Note. Levels of indicators AN⁺PI⁻ and AN⁺PI⁻ indicated are marked as following: N, normal; ↑, increased, ↓, low. Statistically significant differences between patients with indicators of RBTL < 5% and ≥ 5% indicated are marked as following: •, in group 1; *, in group 2; *, in group 3. *, between patients with AN⁺PI⁻ level N and ↑ in group 1; *, between patients with AN⁺PI⁻ level N and ↓ in group 1, and *, in group 3. p < 0.05.

клеток, находящихся на ранней и поздней стадии апоптоза ($r = 0,7$; $p = 0,0$) и обратная с живыми клетками ($r = -0,9$; $p = 0,0$).

Анализ изменений активности апоптоза в отдельных группах больных показал, что у пациентов с двусторонней деструкцией (группа 3) выявлено отчетливое увеличение лимфоцитов AN⁺PI⁻, с одновременным снижением числа интактных клеток. У пациентов с односторонней деструкцией выявлено отсутствие значимых изменений в среднем содержании апоптотических и интактных лимфоцитов при сравнении с контролем. Число апоптотических клеток, находящихся на поздних стадиях апоптоза, у пациентов всех групп по средним показателям сохранялось в пределах нормы.

Для более детального определения клинико-диагностической значимости апоптоза лимфоцитов исследована информативность различных показателей программируемой клеточной гибели Т-лимфоцитов и их уровней при разных вариантах течения ЛУ-ФКТ (табл. 2).

На основании обследования здоровых лиц количество лимфоцитов в раннем апоптозе, равное $14 \pm 3,6\%$, принято за нормальный уровень. На основании сопоставления этих данных с результатами обследования больных в качестве диагностически значимых уровней апопто-

за Т-лимфоцитов для оценки тяжести процесса были выбраны показатели, превышающие норму на 25% и выше и практически не встречающиеся у здоровых. Учет показателей активности апоптоза позволил выявить не только диагностически значимый уровень отдельных параметров апоптоза, но и оценить возможность использования их сочетаний. Как видно из таблицы 2, показателями, практически не встречающимися у здоровых лиц и наиболее информативными в плане оценки распространенности процесса, оказались высокие значения раннего апоптоза лимфоцитов AN⁺PI⁻ > 17,5%, AN⁺PI⁻ ≥ 25%, низкий уровень интактных клеток (< 75%), а также высокие значения позднего апоптоза AN⁺PI⁺ (> 4,5%). Низкое содержание интактных клеток в любых сочетаниях лишь отражает увеличение количества лимфоцитов с маркерами раннего апоптоза ($r = -0,96$; $p = 0,0$). Высокая активность апоптоза наиболее характерна для больных ФКТ с двусторонними деструктивными изменениями в легких.

Таким образом, преимущественной диагностической значимостью для оценки характера патологических изменений в легких при ЛУ-ФКТ обладает процент лимфоцитов в фазе раннего апоптоза. Комплексная оценка показателей раннего и позднего апоптоза лимфоцитов может повысить достоверность полученных данных.

ТАБЛИЦА 4. ПОКАЗАТЕЛИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ЛУ-ФКТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПРОЦЕССА И АКТИВНОСТИ АПОПТОЗА (ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ, %)

TABLE 4. INDICATORS OF SUBPOPULATION COMPOSITION OF LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH DRUG-RESISTANT FCTB DEPENDING ON THE PREVALENCE OF PROCESS AND ACTIVITY OF APOPTOSIS (FREQUENCY OF DETECTION, %)

Показатели Parameters	Число клеток Number of cells %	Больные ФКТ Группа 1 Patients with FCTB Group1		Односторонний ФКТ Группа 2 Unilateral FCTB Group 2		Двусторонний ФКТ Группа 3 Bilateral FCTB Group 3		Здоровые Группа 4 Healthy Group 4
		Частота выявления лиц с показателями AN*PI- (%) Detection frequency of individuals with indicators AN*PI- (%)						
		N n = 42	↑ n = 22	N n = 32	↑ n = 8	N n = 10	↑ n = 14	N n = 23
CD3+CD4+	> 50	26,2*	13,6	21,9*	0	40*	21,4	4,3
CD3+CD8+	≥ 35	28,6*	18,2*	28,1*	0	30*	21,4	0
CD 3-D16+	< 10	35,7	40,9	31,3	50	50	35,7	21,7
CD3+CD16+	≥ 7	23,8	9,1	31,3	12,5	0	7,14	13,0
CD19+	≥ 20	7,14 [■]	31,8* [■]	9,4*	50* [*]	0*	21,4* [*]	4,3
CD3+HLA-DR+	≥ 5	42,9* [■]	13,6 [■]	43,8*	25	30	7,1	4,3
CD3+HLA-DR+	≥ 20	9,52	18,2	12,5	37,5	0	7,1	4,3
CD25+	≥ 20	22,5* [■]	0 [■]	28,1* [*]	0*	10	0	4,3
CD95+	≥ 55	47,6*	36,4	50* [*]	12,5*	40	50*	17,4

Примечание. N – нормальный уровень AN⁺PI⁻; ↑ – повышенный уровень AN⁺PI⁻. * – достоверные различия между больными (группы 1-3) и здоровыми (группа 4); между больными с уровнем AN⁺PI⁻ «N» и «↑»: [■] – в группе 1, [•] – в группе 2, * – в группе 3. p < 0,05.

Note. N, normal AN⁺PI⁻ level; ↑, increased AN⁺PI⁻ level. Statistically significant differences between patients are marked as following: *, groups 1-3 and healthy (group 4); [■], between patients with AN⁺PI⁻ level "N" and "↑" in group 1; [•], in group 2, and *, in group 3. p < 0.05.

Учитывая важную роль апоптоза в реализации иммунных процессов, изучена взаимосвязь активности раннего апоптоза (AN⁺PI⁻) с выраженностью ряда иммунологических показателей при ЛУ-ФКТ разной степени тяжести. Показано, что сниженный пролиферативный ответ лимфоцитов на туберкулин (< 5%) в подавляющем большинстве случаев отмечался у пациентов с двусторонним поражением легких (в 90,9% случаев vs 40% у пациентов с односторонним поражением при среднем уровне 3,8 vs 7,7%, p < 0,05).

Как видно из таблицы 3, низкий пролиферативный ответ на туберкулин (< 5%) достоверно чаще ассоциируется с высоким уровнем раннего апоптоза. Рассмотрение этих показателей в отдельных группах больных выявило неоднозначные результаты. У больных с односторонней деструкцией в легких (группа 2) сниженная и повышенная пролиферация лимфоцитов при высоком уровне апоптоза встречалась с одинаковой частотой. Напротив, у большинства пациентов с двусторонним ФКТ (группа 3) положительный пролиферативный ответ зарегистрирован исключительно при невысокой активности апоптоза. Полученные данные подтверждаются сильной

отрицательной корреляционной связью выраженности апоптоза и пролиферативной активности у больных с двусторонней деструкцией (r = -0,7; p < 0,02).

Альтернативная закономерность прослеживается при определении взаимосвязи антиген-специфического ответа с числом интактных клеток. Эта зависимость также наиболее отчетливо выражена у больных двусторонним ФКТ, что подтверждается выявленной у них прямой корреляционной связью (r = 0,65; p = 0,02). Таким образом, у больных ЛУ-ФКТ альтернативность реакций апоптоза и пролиферации преимущественно выражена именно при распространенном двухстороннем деструктивном процессе легких.

Изучение субпопуляционного состава лимфоцитов показало, что все больные ФКТ (группа 1) с уровнем AN⁺PI⁻ в пределах нормы отличались от пациентов с повышенным уровнем AN⁺PI⁻ большей частотой встречаемости CD25⁺, CD3⁺DR⁺ и CD3⁺CD16⁺ клеток (табл. 4). У пациентов с высокой активностью апоптоза существенных отличий от доноров не было, за исключением повышенного содержания В-лимфоцитов (в 31,8%

ТАБЛИЦА 5. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ В ОТВЕТ НА СТИМУЛЯЦИЮ ППД У БОЛЬНЫХ ЛУ-ФКТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПРОЦЕССА И АКТИВНОСТИ АПОПТОЗА (ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ, %)

TABLE 5. CYTOKINE PRODUCTION BY *IN VITRO* PPD STIMULATED PBMCs IN PATIENTS WITH DRUG-RESISTANT FCTB DEPENDING ON THE PREVALENCE OF PROCESS AND ACTIVITY OF APOPTOSIS (FREQUENCY OF DETECTION, %)

Цитокины Cytokines	Уровень продукции, пг/мл Production level, pg/ml	Больные ФКТ Группа 1 Patients with FCTB Group 1		Односторонний ФКТ Группа 2 Unilateral FCTB Group 2		Двусторонний ФКТ Группа 3 Bilateral FCTB Group 3		Здоровые Группа 4 Healthy Group 4
		Частота выявления лиц с показателями AN*PI (%) Detection frequency of individuals with indicators AN*PI (%)						
		N n = 26	↑ n = 30	N n = 18	↑ n = 15	N n = 8	↑ n = 15	N n = 23
IFNγ	< 50	34,6	50*	27,8	60,0*	50	40*	13,04
IL-2	≤ 20	53,8*■	23,3*■	44,4*	20	75* *	26,6*	0
TNFα	≤ 250	27*	43,3*	5,6*	40* *	75,0*	46,6*	0
IL-8	> 80 000	53,8*■	13,3■	61,1* *	18,2*	25,0	6,7	0
	< 50 000	11,5*■	50*■	11,1* *	46,6* *	12,5* *	53,3*	69,5
IL-10	< 50	65,3*	50	50	40	100* *	60* *	26,1
IL-10	> 200	7,7	13,3	11,1	0	0*	26,6* *	0

Примечание. См. примечание к таблице 5.

Note. As for Table 5.

случаев) и CD3⁺CD8⁺ клеток (в 18,2% случаев). Установлена отрицательная корреляция количества апоптотических клеток с содержанием НК-клеток ($r = -0,63$; $p = 0,001$).

Низкий и нормальный уровень апоптоза при одностороннем процессе в легких (группа 2) у части пациентов ассоциировался с повышенным содержанием CD4⁺, CD8⁺ лимфоцитов и активированных Т-лимфоцитов (CD25⁺, CD95⁺ лимфоцитов). При двустороннем процессе (группа 3) больные с низкой активностью апоптоза отличались также повышенным содержанием CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, но лишь тенденцией к повышению CD3⁺HLA-DR⁺ и CD95⁺ лимфоцитов. Выраженный апоптоз у пациентов группы 2 и 3 ассоциировался с отсутствием повышенных значений CD25⁺ лимфоцитов, повышением концентрации В-лимфоцитов во всех случаях, а CD95⁺ клеток — только у пациентов с двусторонним ФКТ. При этом у больных с односторонним ФКТ выявлена отрицательная корреляция апоптотических клеток с НК-клетками ($r = -0,64$; $p = 0,047$), в группе с двухсторонним ФКТ корреляционные связи отсутствовали.

Таким образом, изменения субпопуляционного состава лимфоцитов у больных с одно- и двусторонним ФКТ в основном носили однотипный характер, за исключением экспрессии маркера поздней активации CD95⁺. Но интенсивность клеточного ответа при ограниченном ФКТ была выше. Увеличение числа апоптотических клеток ассоциируется с повышением коли-

чества В-лимфоцитов, снижением концентрации лимфоцитов CD25⁺ и только при двустороннем ФКТ — с повышенным уровнем CD95⁺ клеток, но сниженным при одностороннем ФКТ. Низкий уровень апоптоза сопряжен с повышением уровня Т-хелперов, цитотоксических и активированных Т-клеток. У всех больных ЛУ-ФКТ при повышении числа апоптотических клеток отмечено нарастание синтеза противотуберкулезных антигенов (по ИФА и РПГА, $r = 0,9$; $p = 0,006$).

Результаты изучения взаимосвязи продукции цитокинов с выраженностью апоптоза у больных прогрессирующим ФКТ представлены в таблице 5.

Продукция IFN γ в ответ на PPD у всех больных ЛУ-ФКТ оказалась значительно более низкой, чем у здоровых доноров. Наиболее низкое содержание IFN γ зарегистрировано при распространенных процессах. При повышении числа апоптотических клеток у больных с односторонним ФКТ в 2 раза увеличилась доля лиц с низкой выработкой IFN γ , при двустороннем ФКТ изменений не было (табл. 5).

Продукция IL-2, индуцированного PPD, так же как и IFN γ , у всех больных ФКТ (группа 1-3) была снижена, более значительно при распространенном процессе (группа 3). При нарастании числа апоптотических клеток продукция IL-2, в отличие от IFN γ , увеличивалась как при ограниченном (группа 2), так и при распространенном (группа 3) ФКТ, что подтверждается прямой корреляционной зависимостью у больных с ограни-

ченным процессом ($p = 0,4$; $r = 0,01$). При этом уровня контрольных значений продукция IL-2 не достигала.

Выработка TNF α в ответ на PPD у всех обследованных больных была достоверно ниже, чем у доноров, наиболее низкая при двустороннем процессе в легких. Изменения в продукции TNF α у больных с одно- и двусторонней деструкцией при различной выраженности апоптоза имели разнонаправленный характер (табл. 5). Увеличение числа апоптотических клеток при ограниченном ФКТ коррелировало со снижением выработки TNF α ($p = -0,32$; $r = 0,03$), при распространенном ФКТ, напротив, отмечается отчетливая тенденция к прямой зависимости выраженности апоптоза и продукции TNF α .

Продукция IL-8, индуцированного PPD, у всех больных ЛУ-ФКТ была достоверно выше, чем в контроле, в основном за счет пациентов с односторонней деструкцией легких. Повышение числа апоптотических клеток, независимо от распространенности процесса, коррелировало с достоверным снижением уровня продукции IL-8 ($r = -0,34$; $p = 0,0003$), отличаясь лишь по своей интенсивности. Наиболее резкое снижение продукции IL-8 при увеличении апоптоза отличало больных с ограниченным процессом, что подтверждается отрицательной корреляционной связью ($r = -0,42$; $p = 0,005$). При двустороннем ФКТ снижение продукции IL-8 было менее выраженным, что, по-видимому, связано с исходно более низкой выработкой IL-8 в ответ на PPD у большинства больных этой группы.

Продукция IL-10 в ответ на индукцию PPD более чем у половины обследованных больных МЛУ-ФКТ была достоверно снижена, наиболее часто при распространенном процессе. Изменения в выработке IL-10 у больных 2 и 3 группы при увеличении апоптоза были не однозначны. При ограниченном ФКТ доля больных с низкой продукцией IL-10 от увеличения количества апоптотических клеток практически не менялась, при распространенном достоверно уменьшилась (табл. 5).

Таким образом, у больных ЛУ-ФКТ, независимо от протяженности деструктивных изменений в легочной ткани и активности апоптоза, имело место: снижение продукции IL-2, IFN γ , TNF α , IL-10 и повышение выработки IL-8 в ответ на стимуляцию PPD. При изменении интенсивности апоптоза в продукции цитокинов выявлены определенные отличия, сопряженные с распространенностью процесса.

Обсуждение

Особенности иммунного статуса, выявленные при каждой из изученных форм туберкуле-

за легких, дают более полное представление о патогенезе заболевания. Повышение апоптоза в ранней стадии в сочетании с неизменным поздним апоптозом и низким числом интактных клеток было характерно для всей группы больных ЛУ-ФКТ. Наиболее высокой активностью апоптоза отличались больные с двусторонней деструкцией легких и неблагоприятным течением заболевания, что связано с имеющейся у них выраженной депрессией Т-клеточного звена иммунитета [3, 20].

Обращает на себя внимание отсутствие высоких показателей апоптоза у большей части пациентов с односторонним поражением легкого. На неизменное число апоптотических и пролиферирующих клеток у пациентов с ФКТ указывали и другие авторы [20]. По-видимому, у ряда этих больных, в отличие от пациентов с двусторонним процессом, сохраняются функциональные резервы иммунокомпетентных клеток, и процессы индукции апоптоза и пролиферации лимфоцитов частично сбалансированы. В этом случае апоптоз может способствовать ограничению чрезмерного воспаления. Это предположение подтверждается наличием обратной зависимости между активностью раннего и позднего апоптоза и числом пораженных участков легкого у 14 пациентов с процессом, ограниченным 3 сегментами ($r = -0,97$; $p = 0,005$). При увеличении протяженности патологического процесса в легких указанная зависимость исчезает. Более низкое содержание в периферической крови лимфоцитов у этих больных, возможно, объясняется интенсивным переходом клеток в ткань с последующим развитием в ней иммунологических процессов, что, по-видимому, связано с сохраняющимися у них адаптационными механизмами иммунной системы в условиях недостаточности клеточного иммунитета. Выраженность раннего и позднего апоптоза и, как следствие, количества живых клеток отражает степень прогрессирования деструктивного процесса в легких при ЛУ-ФКТ. Соответствие интенсивности параметров апоптоза степени прогрессирования деструктивного процесса в легких указывает на его клинко-диагностическую значимость и возможность использования для оценки характера туберкулезного процесса и прогнозирования его течения.

Степень активации апоптоза сопряжена как с характером процесса при туберкулезе, так и с факторами иммунного ответа на молекулярном и клеточном уровне, способными влиять на процесс клеточной гибели. Известно, что реакции апоптоза и пролиферативного ответа альтернативны [26]. Потеря равновесия между пролиферацией Т-клеток и активационной клеточной гибелью приводит к элиминации специфических

клонов, ослаблению иммунного ответа с последующей бактериемией и персистированием инфекции [5, 23].

Выявленное нами усиление апоптоза у больных с двусторонним деструктивным процессом в легких согласуется с выраженным угнетением антигенспецифического ответа, что подтверждается отрицательной корреляционной связью выраженности апоптоза и пролиферативной активности ($r = -0,7$; $p < 0,02$). При односторонней деструкции у больных ФКТ низкий и высокий пролиферативный ответ лимфоцитов на РРД, на фоне усиления апоптоза, встречается практически с одинаковой частотой (45,5 и 54,5%), что свидетельствует о сохранности функционального состояния лимфоцитов у части пациентов этой группы.

Максимальное снижение антигенспецифического ответа при неуклонно прогрессирующем ЛУ-ФКТ с обширной деструкцией в обоих легких, по-видимому, объясняется инфекционно-токсическим повреждением лейкоцитов, их функциональным истощением, временной или стойкой рефрактерностью клеток в ответ на антигенный стимул и указывает преимущественно на Th2-тип иммунного ответа. Постоянная стимуляция Т-лимфоцитов избытком микобактериальных антигенов сопровождается антиген-индуцированным апоптозом Т-клеток, что, наряду с низкой пролиферацией, приводит к развитию патологической толерантности иммунной системы и иммунодепрессивному состоянию [1, 3, 5, 11, 54].

Наряду с изменениями в функциональной активности лимфоцитов нами выявлена зависимость количественных параметров субпопуляционного статуса как от выраженности апоптоза, так и от распространенности процесса. Больные с односторонним ФКТ и низким уровнем апоптоза отличались высоким содержанием Т-хелперов, цитотоксических клеток и клеток, несущих активационные маркеры ($CD25^+$, $CD95^+$, $CD3^+DR^+$ лимфоциты). Эти клетки функционально активны, участвуют в распознавании антигенов, продуцируют различные цитокины, участвуют в регуляции иммунного ответа. Невысокое количество апоптотических клеток, выраженный антигенспецифический ответ лимфоцитов, активация Т-лимфоцитов, более ограниченный характер процесса указывают на развитие адаптационных механизмов в процессе длительно текущей хронической инфекции, протективную роль иммунокомпетентных клеток и ограничительную роль апоптотических клеток у этой группы пациентов.

Низкий уровень апоптоза у больных с двусторонним ФКТ согласуется с увеличением числа Т-хелперов, но лишь тенденцией к повышению

количества активированных клеток ($CD95^+$, $CD3^+DR^+$) и низким содержанием клеток, экспрессирующих рецептор к IL-2 ($CD25^+$). Все это косвенно указывает на неполноценную функцию иммунокомпетентных клеток. Однако увеличение NK-клеток при низком уровне апоптоза, подтвержденное отрицательной корреляцией ($r = -0,64$; $p = 0,047$), свидетельствует об имеющейся у больных компенсаторной активации неспецифического компонента защитных реакций. Выявленные количественные изменения клеток сочетаются с наличием положительного пролиферативного ответа. По-видимому, адекватной активации иммунокомпетентных клеток в ответ на МБТ у этой группы более тяжелых больных уже нет, нарастает разбалансированность механизмов иммунной системы, но потенциальная возможность клеток отвечать на антигенный раздражитель еще сохранена.

Высокий уровень раннего апоптоза, независимо от распространенности процесса, сочетался со смещением в сторону преимущественно Th2-ответа (снижение числа $CD4^+$, $CD8^+$, NK-клеток), наряду с увеличением $CD19^+$ лимфоцитов и нарастанием противотуберкулезных антител, подтвержденным у больных с двусторонним ФКТ прямой ассоциацией с числом апоптотических клеток ($r = 0,9$; $p = 0,006$). На низкую способность лимфоцитов к пролиферации и дифференцировке при распространенном ФКТ указывает увеличение числа клеток с маркером готовности к апоптозу ($CD95^+$) и снижение числа активированных Т-лимфоцитов ($CD25^+$). Интерес представляет разнонаправленное изменение концентрации $CD95^+$ лимфоцитов при нарастании активности апоптоза у больных с ограниченным и распространенным ФКТ, а именно его повышение при двустороннем ФКТ и снижение при одностороннем ФКТ. Возможно, это связано с разными механизмами программируемой клеточной гибели у больных с ограниченным и распространенным процессом и требует дальнейшего исследования. Возможное участие $CD8^+$ клеток в запуске механизма апоптоза у больных с распространенным процессом подтверждается наличием отчетливой прямой ассоциации числа клеток в фазе позднего апоптоза с относительным числом цитотоксических лимфоцитов ($r = 0,55$; $p = 0,04$) и обратной с абсолютным и относительным числом Т-хелперов ($r = -0,6$; $p = 0,02$).

Все сказанное свидетельствует о том, что больные ФКТ, независимо от протяженности деструктивных изменений при высокой активности апоптоза, характеризуются выраженной недостаточностью клеточного иммунитета, но его относительной сохранностью при умеренной активности апоптоза.

Первостепенную роль в регуляции апоптоза и пролиферации клеток играют цитокины [13, 22, 34, 47]. Выявлена отчетливая зависимость в изменениях цитокинового статуса и от степени интенсивности апоптоза, и от выраженности деструктивного процесса. Исключительно важную роль в реализации механизмов клеточной защиты, имеющих при туберкулезе определяющее значение, играют $IFN\gamma$, IL-2 и $TNF\alpha$.

Продукция $IFN\gamma$, IL-2 и $TNF\alpha$ была снижена у всех обследованных больных МЛУ-ФКТ, но наиболее резко — у больных с двусторонней деструкцией, что, очевидно, связано с иммуносупрессивным состоянием больных МЛУ-ФКТ, обусловленным повышенным апоптозом лимфоцитов, снижением числа и функционирования иммунокомпетентных клеток. С изменением интенсивности апоптоза продукция $IFN\gamma$, IL-2 и $TNF\alpha$ менялась неоднозначно. Увеличение числа апоптотических клеток сопровождалось снижением выработки $IFN\gamma$ и нарастанием продукции IL-2. Доля больных с низкой выработкой IL-2 сократилась в 2,5 раза. При этом в ряде работ отмечено, что низкий уровень $IFN\gamma$ сохраняется длительное время после окончания успешной противотуберкулезной химиотерапии [22, 33]. По-видимому, в результате длительного массивного антигенного воздействия у больных ФКТ резервы моноцитарно-макрофагальной системы и функции Т-лимфоцитов предельно истощены и подлежат длительному восстановлению. Нарастание продукции IL-2 на фоне увеличения апоптоза, независимо от распространенности процесса, подтвержденное прямой корреляцией с числом апоптотических клеток ($r = 0,4$; $p = 0,0007$) и обратной с живыми ($r = -0,37$; $p = 0,002$), на первый взгляд выглядит «парадоксально». Складывается впечатление, что IL-2 способствует апоптотической гибели Т-клеток, в то время как он относится к физиологическим ингибиторам апоптоза, являясь фактором роста клеток и выживания. Однако IL-2 среди цитокинов занимает особое положение благодаря своему выраженному разнонаправленному (как проапоптотическому, так и антиапоптотическому) влиянию на апоптоз иммунокомпетентных клеток [6, 8, 13, 19, 27, 46]. Показано, что эффект действия IL-2 определяется физиологическим состоянием лимфоцитов. При разных процессах и состояниях в клетке меняется состав белковых регуляторов, соответственно этому IL-2 способен разнонаправленно действовать на апоптоз. Проапоптотические эффекты IL-2 носят дозозависимый характер, осуществляются при участии митохондриальных факторов, связаны с состоянием внутриклеточных сигнальных систем и в итоге с соотношением анти- и проапоптотических белков семейства Bcl-2 [18, 27, 46]. У больных не-

уклонно прогрессирующим ФКТ IL-2 также может действовать как проапоптотический фактор, усиливая экспрессию рецепторов и лигандов Fas и $TNF\alpha$, стимулируя пролиферацию Т-клеток [6, 46] и последующий апоптоз.

Проапоптотическое действие высокого уровня $TNF\alpha$, индуцируемого PPD, на фоне высокой апоптотической активности отчетливо проявляется у больных с двусторонней деструкцией, что согласуется с нарастанием $CD95^+$ клеток. Возможно, у этой группы больных имеет место рецепторный (экзогенный) апоптоз лимфоцитов, индуцируемый провоспалительным цитокином $TNF\alpha$. Кроме того, $TNF\alpha$ способен вызывать и некроз клеток как результат их гибели в очаге воспаления.

Напротив, для больных с деструкцией, ограниченной одним легким, характерна отрицательная взаимосвязь апоптотических клеток с уровнем $TNF\alpha$, стимулированным PPD ($r = -0,32$; $p = 0,03$). У пациентов с односторонней деструкцией при высоком уровне апоптотической гибели клеток достоверно чаще, чем у больных с умеренной активностью апоптоза, выявляется низкая продукция $TNF\alpha$. В этом случае угнетение продукции $TNF\alpha$, с одной стороны, может быть обусловлено супрессией клеток-продуцентов $TNF\alpha$ в ответ на PPD, в связи с длительным действием избытка антигена, активностью Treg-клеток. С другой стороны, можно предположить, что у больных с ограниченной деструкцией в легких основной путь апоптоза в клетке — митохондриальный, обусловленный сдвигом баланса про- и антиапоптотических членов семейства Bcl-2 в сторону проапоптотических (Bad) белков. Снижение числа $CD95^+$ лимфоцитов при нарастании апоптоза у этой группы пациентов косвенно подтверждает возможность митохондриального пути апоптоза [7, 8]. Проведенные экспериментальные и клинические исследования выявили дозозависимый характер проапоптотических эффектов рекомбинантных $TNF\alpha$, IL-2 и IL-4 и показали участие этом процессе АФК, что свидетельствует о связи процессов апоптоза с дисфункцией митохондрий [7, 8, 17, 18]. Также в литературе имеются данные, свидетельствующие о возможности антиапоптотического действия $TNF\alpha$. В одних случаях итогом взаимодействия $TNF\alpha$ со специфическим рецептором ($TNFR1$) является запуск апоптоза, в других — защита от программируемой гибели [1, 6, 35, 43]. Выявленные особенности в продукции $TNF\alpha$, сопряженные с активностью апоптоза, у больных МЛУ-ФКТ требуют дальнейшего исследования.

Высокий уровень провоспалительного цитокина IL-8, стимулированного PPD, на фоне низкой активности апоптоза, указывает на наличие выраженного воспалительного компонента, при-

ток клеток в очаги воспаления. Постоянно высокие уровни IL-8 характерны для пациентов с прогрессированием туберкулеза и лекарственной устойчивостью [2, 4, 9].

Нами выявлена существенная зависимость выработки IL-8 от интенсивности апоптоза. Увеличение числа апоптотических клеток сопряжено с достоверным уменьшением доли больных с повышенной выработкой IL-8. Низкий уровень активности апоптоза согласуется с высокой индуцированной продукцией IL-8 у пациентов ЛУ-ФКТ. Выявленная зависимость подтверждена отрицательной корреляционной связью количества лимфоцитов в фазе раннего апоптоза с уровнем продукции IL-8 ($r = -0,42$; $p = 0,005$) и, напротив, положительной — с количеством живых (интактных) клеток ($r = 0,37$; $p = 0,01$). Об альтернативности реакций апоптоза и продукции IL-8 свидетельствуют работы группы авторов, показавших, что IL-8 активирует антиапоптотический ген Bcl-2 и уменьшает активность проапоптотического гена каспазы-3. Подавление секреции IL-8 способствовало апоптозу клеток опухоли различного генеза, что было использовано для борьбы с опухолевыми клетками [4, 26, 40].

IL-10 — противовоспалительный цитокин, универсальный ингибитор всего клеточно-опосредованного ответа. Его главная функция — ограничение и купирование воспалительного процесса [13, 36]. У всех обследованных в работе больных ФКТ, независимо от интенсивности апоптоза, определялось достоверное снижение выработки IL-10, наиболее выраженное у больных с двусторонним ФКТ. Сходные данные о подавлении экспрессии не только IFN γ и IL-2, но и IL-10 у больных ЛУ-ТБ получены рядом исследователей [24, 50]. Очевидно, глубокая депрессия иммунного ответа у больных с неуклонно прогрессирующим ЛУ-ФКТ приводит к угнетению выработки IL-10. Длительное снижение продукции IL-10, на фоне усиления продукции провоспалительных цитокинов, лежит в основе прогрессирования туберкулеза легких [34]. Снижение продукции IL-10 при тяжелой туберкулезной инфекции можно объяснить и активацией Treg-клеток с избыточной продукцией TGF- β [21, 52], и стимуляцией В-клеток иммунными комплексами или апоптотическими тельцами, образующимися на поздних этапах апоптоза [7].

Вместе с тем у части больных с двусторонним процессом при увеличении активности апоптоза увеличивалась и продукция IL-10. При этом повышение выработки IL-10 в ответ на PPD ассоциировалось с низким пролиферативным ответом, низким уровнем IFN γ и повышением продукции TNF α и IL-2, выступающих в роли проапоптотического фактора, что при выраженной вос-

палительной реакции, очевидно, также должно способствовать ограничению патологического процесса [29]. Но, возможно, это связано и с преобладанием Th2, активацией Treg-клеток, продукцией цитокинов Th2-профиля, включающих IL-10 с проапоптотической и иммуносупрессорной активностью [7, 13, 21, 52]. Одновременно показано, что усиленная продукция IL-10, наряду с повышенным апоптозом и анергией Т-клеток, ассоциируется с макрофагами, характеризующимися снижением уровня IFN γ и усиленной продукцией IL-6, IL-10 [12]. Однако в большинстве случаев потенциал IL-10 при неуклонно прогрессирующем ЛУ-ФКТ, в связи с выраженным иммунодефицитом, остается низким и не приводит к ограничению воспалительного процесса [6].

Заключение

Активность апоптоза при ЛУ-ФКТ тесно коррелирует с распространенностью процесса, но неоднозначно меняется при отклонениях в иммунном статусе у разных групп больных. При увеличении активности апоптоза неоднозначность изменения ряда иммунологических параметров сопряжена с различной протяженностью деструктивного процесса. Повышение апоптотической гибели клеток у всех больных ассоциировалось с угнетением антигенспецифического пролиферативного ответа, снижением уровня CD25 $^{+}$ лимфоцитов, повышением числа В-клеток, наряду со снижением продукции IFN γ , IL-8, и повышением IL-2 в ответ на PPD. При односторонней деструкции увеличение активности апоптоза, наряду с названными изменениями, сопровождалось снижением количества CD95 $^{+}$ клеток, уменьшением продукции TNF α ; при двусторонней деструкции, напротив, отличалось высоким содержанием CD95 $^{+}$ лимфоцитов, увеличением выработки TNF α и IL-10. Высокий уровень апоптоза в сочетании с низкой экспрессией CD25 $^{+}$ клеток, повышенным уровнем CD19 $^{+}$ и CD95 $^{+}$ лимфоцитов при нормальном содержании остальных субпопуляций лимфоцитов и низким антигенспецифическим ответом, наряду со сниженной продукцией IFN γ , IL-8 и увеличенной выработкой IL-2, TNF α , IL-10, является показателем выраженной дисрегуляции иммунного ответа и крайне неблагоприятного течения процесса.

Подобные изменения в показателях апоптоза и иммунного ответа могут быть связаны с состоянием иммунокомпетентных клеток, их ареактивностью, возможно, с разными путями реализации апоптоза, а также с иммуносупрессивным и активирующим апоптоз лимфоцитов действием ЛУ-МБТ. Выраженность раннего и позднего апоптоза и, как следствие, количества живых клеток

отражает степень прогрессирования деструктивного процесса в легких при ФКТ. Показана возможность прогнозирования распространенности деструктивных изменений в легких на основе выраженности маркеров апоптоза. Клинически значимыми оказались показатели активности раннего апоптоза Т-лимфоцитов, превышающие норму на 25% и выше.

Выявленные в работе закономерности свидетельствуют, что комплексный учет показателей апоптоза совместно с иммунологическими пара-

метрами обладает более высокой информативностью при оценке состояния иммунокомпетентных клеток, характера процесса и тенденций его развития,

Изменения программируемой гибели лимфоцитов при туберкулезе в совокупности с параметрами иммунитета позволяют оценить преимущественно защитную или патологическую роль апоптоза в каждом отдельном случае с последующим обоснованием целесообразности назначения иммунотерапии.

Список литературы / References

1. Есимова И.Е., Уразова О.И., Новицкий В.В., Хасанова Р.Р., Кошкина А.А., Чурина Е.Г. Причины дисрегуляции иммунного ответа при туберкулезе легких: влияние *M. tuberculosis* на течение иммунного ответа // Бюллетень сибирской медицины, 2012. № 3. С. 79-86. [Yesimova I.Ye., Urazova O.I., Novitsky V.V., Khasanova R.R., Koshkina A.A., Churina Ye.G. The causes of dysregulation of immune response in pulmonary tuberculosis: the impact of *M. tuberculosis* on the course of immune response. *Byulleten sibirskoy meditsiny* = *Bulletin of Siberian Medicine*, 2012, no. 3, pp. 79-86. (In Russ.)]
2. Китаев М.И., Дуденко Е.В., Сыдыкова С., Токтогонова А.А., Чонорова О.А. Цитокиновый баланс в процессе химиотерапии туберкулеза легких с лекарственной устойчивостью микобактерий // Вестник КРСУ, 2014. Т. 14, № 4. С. 101-103. [Kitaev M.I., Dudenko E.V., Sydykova S., Toktogonova A.A., Chonorova O.A. Cytokine balance in the process of chemotherapy of pulmonary tuberculosis with drug-resistant mycobacteria. *Vestnik Kirgizsko-Rossiyskogo Slavyanskogo universiteta* = *Bulletin of the Kyrgyz-Russian Slavic University (Kyrgyzstan)*, 2014, no. 4, pp. 101-103. (In Russ.)]
3. Кноринг Б.Е., Давыдова Н.И., Басек Т.Ф., Ница Н.А., Елькин А.В. Показатели иммунитета у больных прогрессирующим фиброзно-кавернозным туберкулезом в зависимости от выраженности деструктивных изменений в легких // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 329-336. [Knoring B.E., Davydova N.I., Basek T.F., Nitsa N.A., Elkin A.V. Indicators of immunity in patients with progressive fibro-cavernous tuberculosis, depending on the severity of destructive changes in the lungs. *Meditinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 329-336. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-329-336.
4. Меньяйло М.Е., Малащенко В.В., Шмаров В.А., Газатова Н.Д., Мелашенко О.Б., Гончаров А.Г., Селедцова Г.В., Селедцов В.И. Роль интерлейкина-8 в непосредственной регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 529-536. [Menyaylo M.E., Malashchenko V.V., Shmarov V.A., Gazatova N.D., Melashchenko O.B., Goncharov A.G., Seledtsova G.V., Seledtsov V.I. The role of interleukin-8 in the direct regulation of the functional activity of T-lymphocytes. *Meditinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 529-536. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-529-536.
5. Пичугин А.В., Апт А.С. Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулезной инфекции // Проблемы туберкулеза и болезней легких, 2005. № 12. С. 3-7. [Pichugin A.V., Apt A.S. Apoptosis of the cells of the immune system during tuberculosis infection. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh* = *Problems of Tuberculosis and Lung Diseases*, 2005, no. 12, pp. 3-7. (In Russ.)]
6. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология, 2002. № 4. С. 237-243. [Potapnev M.P. Apoptosis of the cells of the immune system and its regulation by cytokines. *Immunologiya* = *Immunology*, 2002, no. 4, pp. 237-243. (In Russ.)]
7. Потапнев М.П. Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого // Иммунология, 2014. № 2. С. 95-102. [Potapnev M.P. Autophagy, apoptosis, cell necrosis and immune recognition of one's own and someone else's. *Immunologiya* = *Immunology*, 2014, no. 2, pp. 95-102. (In Russ.)]
8. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Жукова О.Б., Сазонова Е.В., Чечина О.Е., Биктасова А.К., Байков А.Н. Молекулярные механизмы влияния интерлейкина-2 на апоптоз лимфоцитов крови // Клеточные технологии в биологии и медицине, 2010. № 2. С. 116-120. [Ryazantseva N.V., Novitsky V.V., Zhukova O.B., Sazonova E.V., Chechina O.E., Biktasova A.K., Baikov A.N. Molecular mechanisms of the effect of interleukin-2 on apoptosis of blood lymphocytes. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine* = *Cell Technologies in Biology and Medicine*, 2010, no. 2, pp. 116-120. (In Russ.)]
9. Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Особенности продукции цитокинов у больных туберкулезом легких // Клиническая лабораторная диагностика, 2013. № 3. С. 18-20. [Salina T.Yu., Morozova T.I. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 3, pp. 18-20. (In Russ.)]
10. Салина Т.Ю., Морозова Т.И. FAS (CD95) антиген и продукция фактора некроза опухоли-α в периферической крови больных с разными клиническими проявлениями туберкулеза // Пульмонология, 2015. Т. 25, № 4. С. 456-460. [Salina T.Yu., Morozova T.I. FAS (CD95) antigen and the production of tumor necrosis factor-α

in the peripheral blood of patients with different clinical manifestations of tuberculosis. *Pulmonologiya = Russian Pulmonology*, 2015, Vol. 15, no. 4, pp. 456-460. (In Russ.)]

11. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Курганова Е.В., Шевела Е.Я., Никонов С.Д., Жданов О.А., Мостовая Г.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Т-клеточная анергия в патогенезе иммунной недостаточности при туберкулезе легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких, 2004. № 11. С. 23-28. [Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Kurganova E.V., Shevela E.Ya., Nikonov S.D., Zhdanov O.A., Mostovaya G.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. T-cell anergy in the pathogenesis of immune insufficiency in pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh = Problems of Tuberculosis and Lung Diseases*, 2004, no. 11, pp. 23-28. (In Russ.)]

12. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Никонов С.Д., Жданов О.А., Оста А.А., Черных Е.Р. Дисфункции макрофагов, генерированных из моноцитов крови больных туберкулезом легких // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 2010. Т. 30, № 2. С. 101-108. [Sakhno L.V., Tikhonov M.A., Nikonov S.D., Zhdanov O.A., Osta A.A., Chernykh E.R. Dysfunctions of macrophages generated from monocytes in the blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Byulleten Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*, 2010, Vol. 30, no. 2, pp. 101-108. (In Russ.)]

13. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases]. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.

14. Сомова Л.М., Беседнова 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 disease. *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.

15. Филинчук О.В., Янова Г.В., Стрелис А.К., Уразова О.И., Земляная Н.А., Буйнова Л.Н. Множественно-лекарственно-устойчивый туберкулез легких: медико-социальные особенности и эффективность стационарного этапа лечения // Проблемы туберкулеза и болезней легких, 2008. № 8. С. 23-28. [Filinyuk O.V., Yanova G.V., Strelis A.K., Urazova O.I., Zemlyanaya N.A., Buynova L.N. Multiple drug-resistant pulmonary tuberculosis: medico-social features and effectiveness of the inpatient treatment phase. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkih = Problems of Tuberculosis and Lung Diseases*, 2008, no. 8, pp. 23-28. (In Russ.)]

16. Хонина Н.А., Сахно Л.В., Норкин М.Н., Норкина О.В., Мостовая Г.В., Никонов С.Д., Огиренко А.П., Останин А.А., Черных Е.Р. Апоптоз лимфоцитов как возможный механизм нарушения антигенспецифического ответа при туберкулезе легких // Медицинская иммунология, 2001. Т. 3, № 1. С. 51-59. [Khonina N.A., Sakhno L.V., Norkin M.N., Norkina O.V., Mostovaya G.V., Nikonov S.D., Ogirenko A.P., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Lymphocyte apoptosis as a possible mechanism of violation of the antigen-specific response in pulmonary tuberculosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2001, Vol. 3, no. 1, pp. 51-59. (In Russ.)]

17. Часовских Н.Ю., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Филипенко М.Л., Боярских У.А., Старикова Е.Г., Кайгородова Е.В., Стариков Ю.В., Соколович Е.Г. Белки семейства BCL-2 участвуют в редоксзависимой дезрегуляции апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови при воспалении // Иммунология, 2009. № 2. С. 98-101. [Chasovskikh N.Yu., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V., Filipenko M.L., Boyarskikh U.A., Starikova E.G., Kaygorodova E.V., Starikov Yu.V., Sokolovich E.G. BCL-2 proteins are involved in the redox-dependent deregulation of apoptosis of mononuclear blood leukocytes during inflammation. *Immunologiya = Immunology*, 2009, no. 2, pp. 98-101. (In Russ.)]

18. Чечина О.Е., Биктасова А.К., Сазонова Е.В., Жукова О.Б., Прохоренко Т.С., Крат И.В., Часовских Н.Ю., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза // Бюллетень сибирской медицины, 2009. № 2. С. 67-72. [Chechina O.Ye., Biktasova A.K., Sazonova Ye.V., Zhukova O.B., Prokhorenko T.S., Krat I.V., Chasovskikh N.Yu., Novitsky V.V., Ryazantseva N.V. The role of cytokines in redox-dependent regulation of apoptosis. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2009, no. 2, pp. 67-72. (In Russ.)]

19. Чечина О.Е., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Сазонова Е.В., Биктасова А.К., Жукова О.Б., Марошкина А.Н., Белкина М.В., Кайгородова Е.В., Прохоренко Т.С. Белки семейства BCL-2 – молекулярные мишени проапоптотического действия ИЛ-2 и ИЛ-4 // Иммунология, 2011. № 3. С. 127-130. [Chechina O.Ye., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V., Sazonova E.V., Biktasova A.K., Zhukova O.B., Maroshkina A.N., Belkina M.V., Kaigorodova E.V., Prokhorenko T.S. Proteins of the BCL-2 family – molecular targets for the pro-apoptotic action of IL-2 and IL-4. *Immunologiya = Immunology*, 2011, no. 3, pp. 127-130. (In Russ.)]

20. Чурина Е.Г., Новицкий В.В., Уразова О.И., Филинчук О.В., Теплова Н.В., Есимова И.Е. Показатели апоптоза и пролиферативной активности лимфоцитов у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью к *M. tuberculosis* // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 1-2. С. 119-126. [Churina E.G., Novitsky V.V., Urazova O.I., Filinyuk O.V., Teplova N.V., Esimova I.E. Indicators of apoptosis and proliferative activity of lymphocytes in patients with tuberculosis of the lung with multidrug resistance to *M. tuberculosis*. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 1-2, pp. 119-126. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-1-2-119-126.

21. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Есимова И.Е., Кононова Т.Е., Филинчук О.В., Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И. Факторы дисрегуляции иммунного ответа (на различных этапах его реализации) при туберкулезе легких // Бюллетень сибирской медицины, 2016. Т. 15, № 5. С. 166-177. [Churina E.G., Urazova O.I., Novitsky V.V., Esimova I.E., Kononova T.E., Filinyuk O.V., Kolobovnikova Yu.V., Dmitrieva A.I.

Factors of dysregulation of the immune response (at various stages of its implementation) in pulmonary tuberculosis. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2016, Vol. 15, no. 5, pp. 166-177. (In Russ.)]

22. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С. Оценка влияния γ C-цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на экспрессию молекул поздней активации и апоптоза (CD95 и HLA-DR) CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоцитами в популяции CD45RA Т-клеток *in vitro* // Иммунология, 2018. Т. 39, № 1. С. 20-25. [Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Litvinova L.S. Assessment of the effect of γ C-cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15) on the expression of late activation molecules and apoptosis (CD95 And HLA-DR) CD4⁺ CD8⁺ T-lymphocytes in the population of CD45RA T cells *in vitro*. *Immunologiya = Immunology*, 2018, Vol. 39, no. 1, pp. 20-25. (In Russ.)]

23. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А., Варфоломеева М.И., Григорьева Т.Ю. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико иммунологическом обследовании больных // Медицинская иммунология, 2000. Т. 2, № 1. С. 7-16. [Yarilin A.A., Nikonova M.F., Yarilina A.A., Varfolomeeva M.I., Grigorieva T.Yu. Apoptosis, the role in pathology and the significance of its assessment in the clinical and immunological examination of patients. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, Vol. 2, no. 1, pp. 7-16. (In Russ.)]

24. Boussiotis V., Tsai E.Y., Yunis E.J., Thim S., Delgado J.C., Dascher C.C., Berezovskaya A., Rousset D., Reynes J.-M., Goldfeld A.E. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J. Clin. Invest.*, 2000, Vol. 105, no. 9, pp. 1317-1325.

25. Briken V., Miller J.L. Living on the edge: inhibition of host cell apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol.*, 2008, Vol. 3, no. 4, pp. 415-422.

26. Choi S.H., Park J.Y., Kang W., Kim S.U., Kim D.Y., Ahn S.H., Ro S.W., Han K.H. Knockdown of HIF-1 α and IL-8 induced apoptosis of hepatocellular carcinoma triggers apoptosis of vascular endothelial cells. *Apoptosis*, 2016, Vol. 21, no. 1, pp. 85-95.

27. Devireddy L.R., Green M.R. Transcriptional program of apoptosis induction following interleukin 2 deprivation: identification of RC3, a calcium/calmodulin binding protein, as a novel proapoptotic factor. *Mol. Cell. Biol.*, 2003, Vol. 23, no. 13, pp. 4532-4541.

28. Douglas I.S., Diaz del Valle F., Winn R.A., Voelkel N.F. Beta-catenin in the fibroproliferative response to acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2006, Vol. 34, no. 3, pp. 274-285.

29. Eum S.Y., Jeon B.Y., Min J.H., Kim S.C., Cho S., Park S.K., Cho S. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 in whole blood is associated with disease progression in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis patients. *Respiration*, 2008, Vol. 76, no. 3, pp. 331-337.

30. Hildeman D.A., Zhu Y., Mitchell T.C., Kappler J., Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death *in vivo*. *Curr. Opin. Immunol.*, 2002, Vol. 14, no. 3, pp. 354-359.

31. Hirsch C.S., Johnson J.L., Okwera A., Kanost R.A., Wu M., Peters P., Muhumuza M., Mayanja-Kizza H., Mugerwa R.D., Mugenyi P., Ellner J.J., Toossi Z. Mechanisms of apoptosis of T-cells in human tuberculosis. *J. Clin. Immunol.*, 2005, Vol. 25, pp. 353-364.

32. Hirsch C.S., Toossi Z., Vanham G., Johnson J.L., Peters P., Okwera A., Mugerwa R., Mugenyi P., Ellner J.J. Apoptosis and T cell hyporesponsiveness in pulmonary tuberculosis. *Infect. Dis.*, 1999, Vol. 179, no. 4, pp. 945-953.

33. Kleinnijenhuis J., Oosting M., Plantinga T., van der Meer J.W., Joosten L.A., Crevel R.V., Netea M.G. Autophagy modulates the *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine response. *Immunology*, 2011, Vol. 134, pp. 341-348.

34. Knoring B.E., Davydova N.I., Shulgina M.V., Kravtsov V.Y., Zilber E.K., Yablonskii P.K. Features of cytokine profile in patients with progressive TB-induced pulmonary fibrosis characterized by various intensities of pulmonary destructive changes. *Prensa. Med. Argen.*, 2016, Vol. 102, no. 2, pp. 2-9.

35. Lee J.S., Song C.H., Lim J.H., Kim H.J., Park J.K., Paik T.H., Kim C.H., Kong S.J., Shon M.H., Jung S.S., Jo E.K. The production of tumour necrosis factor-alpha is decreased in peripheral blood. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, Vol. 132, no. 3, pp. 443-449.

36. Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 1993, Vol. 11, pp. 165-190.

37. Moraco A.H., Kornfeld H. Cell death and autophagy in tuberculosis. *Semin. Immunol.*, 2014, Vol. 26, no. 6, pp. 497-511.

38. Morrison J., Pai M., Hopewell P.C. Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 2008, Vol. 8, pp. 359-368.

39. Orme I.M. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis*, 2014, Vol. 94, no. 1, pp. 8-14.

40. Pang X., Li K., Wei L., Huang Y., Su M., Wang L., Cao H., Chen T. IL-8 inhibits the apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells by up-regulating Bcl-2 and down-regulating caspase-3. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2015, Vol. 31, no. 3, pp. 307-311.

41. Parandhaman D.K., Narayanan S. Cell death paradigms in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2014, no. 4, p. 31.

42. Pericl F., Liu J.H., Diaz J.L., Blanchard D.K., Wei S., Forni G., Djeu J.Y. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.*, 1994, Vol. 24, no. 2, pp. 440-444.

43. Quesniaux V.F., Jacobs M., Allie N., Grivennikov S., Nedospasov S.A., Garcia I., Olleros M.L., Shebzukho Y., Kupras D., Vasseur V., Rose S., Court N., Vache R., Ryffel B. TNF in host resistance to tuberculosis infection. *Curr. Dir. Autoimmun.*, 2010, Vol. 11, pp. 157-179.
44. Raeber M.E., Zurbuchen Y., Impellizzieri D., Boyman O. The role of cytokines in T-cell memory in health and disease. *Immunol. Rev.*, 2018, Vol. 283, no. 1, pp. 176-193.
45. Rakotosamimanana N., Doherty T.M., Andriamihantsoa L.H., Richard V., Gicquel B., Soares J.L., Zumla A., Razanamparany V.R. Expression of TNF-alpha-dependent apoptosis-related genes in the peripheral blood of Malagasy subjects with tuberculosis. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 4, e61154. doi: 10.1371/journal.pone.0061154.
46. Refaelli Y., van Parijs L., London C.A., Tschopp J., Abbas A.K. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*, 1998, Vol. 8, no. 5, pp. 615-623.
47. Saini N.K., Sinha R., Singh P., Sharma M., Pathak R., Rathor N., Varma-Basil M., Bose M. Mce4A protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces pro inflammatory cytokine response leading to macrophage apoptosis in a TNF- α dependent manner. *Microb. Pathog.*, 2016, Vol. 100, pp. 43-50.
48. Shi J., Sun B.H., Zhou L.R., Wang X.S. Role of IL-10 and TNF- α during *Mycobacterium tuberculosis* infection in murine alveolar macrophage. *Genet. Mol. Res.*, 2016, Vol. 15, no. 3. doi: 10.4238/gmr.15037819.
49. Simmons J.D., Catherine M. Stein C.M., Seshadri C., Campo M., Alter G., Fortun S., Schurr E., Wallis R.S., Churchyard G., Mayanja-Kizza H., Boom W.H., Hawn T.R. Immunological mechanisms of human resistance to persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 18, pp. 575-589.
50. Tan Q., Xie W.P., Min R., Dai G.Q., Xu C.C., Pan H.Q., Miao C.D., Yang Z., Xu W.G., Wang H. Characterization of Th1- and Th2-type immune response in human multidrug-resistant tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, Vol. 31, no. 6, pp. 1233-1242.
51. Vanham G., Toossi Z., Hirsch C.S., Wallis R.S., Schwander S.K., Rich E.A., Ellner J.J. Examining a paradox in the pathogenesis of human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/anergy. *Tuber. Lung Dis.*, 1997, Vol. 78, no. 3-4, pp. 145-158.
52. Vignali D.A., Collison L.W., Workman C.J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 7, p. 523.
53. Wang G., Lin A., Han Q., Zhao H., Tian Z., Zhang J. IFN- γ protects from apoptotic neutrophil-mediated tissue injury during acute *Listeria monocytogenes* infection. *Eur. J. Immunol.*, 2018, Vol. 48, no. 9, pp. 1470-1480.
54. Yan L., Cui H., Xiao H., Zhang Q. Anergic pulmonary tuberculosis is associated with contraction of the Vd2+T cell population, apoptosis and enhanced inhibitory cytokine production. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 8, e71245. doi: 10.1371/journal.pone.0071245.
55. Zhai W., Wu F., Zhang Y., Fu Y., Liu Z. The immune escape mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 2, p. 340.

Авторы:

Кноринг Б.Е. — д.м.н., профессор, научный консультант отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Давыдова Н.И. — к.м.н., заведующая лабораторией иммунологии ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Аветисян А.О. — к.м.н., заведующий туберкулезным легочно-хирургическим (торакальным) отделением ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

Knoring B.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Research Consultant, Department of Laboratory Diagnostics, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Davydova N.I., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunology, A. Nikiforov Russian Center for Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Avetisyan A.O., PhD, (Medicine), Head, Thoracic Surgical Department for Tuberculosis Patients, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Поступила 17.06.2019
Принята к печати 13.09.2019

Received 17.06.2019
Accepted 13.09.2019

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМОЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ ПРИ ЛИМФОГЕННОМ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ

Давлетова К.И.¹, Михайлова Е.С.^{1,2}, Вараксин Н.А.³,
Жураковский И.П.^{1,2}, Проскура А.В.², Сидоров С.В.⁴,
Аутеншлюс А.И.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» — структурное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

³ АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками крови у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа в различных возрастных группах при наличии и отсутствии лимфогенного метастазирования. Исследовали спонтанную и стимулированную поликлональными активаторами продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками периферической крови у 82 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа. С помощью твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрацию IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1 α , TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1. Пациентки были разделены на две возрастные группы: первую группу составили 48 пациенток в возрасте от 45 до 60 лет, а вторую — 34 пациентки в возрасте от 61 до 75 лет. Метастазы в регионарные лимфатические узлы отмечались у 20 пациенток первой группы и у 9 пациенток второй. Исследование показало, что при наличии метастазов в регионарных лимфатических узлах у пациенток в возрасте 45-60 лет индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-4 и IL-1 α был выше, чем у пациенток без лимфогенного метастазирования. Что же касается пациенток в возрасте 61-75 лет, то при наличии метастазов в регионарных лимфатических узлах отмечалось достоверное снижение индекса влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-6, IL-8, IL-1 α , G-CSF, GM-CSF, что было связано с более высоким уровнем спонтанной продукции, при которой действие поликлональных активаторов снижалось. Сравнение индексов влияния поликло-

Адрес для переписки:

Давлетова Кристина Игоревна
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52.
Тел.: 8 (383) 226-35-60.
E-mail: lpciip@211.ru

Address for correspondence:

Davletova Kristina I.
Novosibirsk State Medical University
630091, Russian Federation, Novosibirsk, Krasny ave., 52.
Phone: 7 (383) 226-35-60.
E-mail: lpciip@211.ru

Образец цитирования:

К.И. Давлетова, Е.С. Михайлова, Н.А. Вараксин, И.П. Жураковский, А.В. Проскура, С.В. Сидоров, А.И. Аутеншлюс «Продукция цитокинов иммунокомпетентными клетками крови у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа в различных возрастных группах при лимфогенном метастазировании» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1115-1126. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1115-1126
© Давлетова К.И. и соавт., 2019

For citation:

BK.I. Davletova, E.S. Mikhaylova, N.A. Varaksin, I.P. Zhurakovsky, A.V. Proskura, S.V. Sidorov, A.I. Autenshlyus "Cytokines production by blood immune cells in patients of different age groups with invasive ductal carcinoma of no special type and lymphatic metastases", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1115-1126. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1115-1126
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1115-1126

нальных активаторов на продукцию цитокинов при лимфогенном метастазировании показало, что у пациенток в возрасте 45–60 лет значение индекса влияния значительно превышало таковое у больных в возрасте 61–75 лет, что свидетельствует о высоком стимулирующем эффекте поликлональных активаторов в возрастной группе до 60 лет. Установлено, что корреляционные связи между индексами влияния поликлональных активаторов на продукцию цитокинов и экспрессией рецепторов ER, PR, HER2/NEU и Ki-67, на основании которых определяют молекулярно-генетический подтип опухоли, в различных возрастных группах существенно отличались.

Ключевые слова: цитокины, иммунокомпетентные клетки крови, поликлональные активаторы, рак молочной железы, инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, лимфогенное метастазирование

CYTOKINES PRODUCTION BY BLOOD IMMUNE CELLS IN PATIENTS OF DIFFERENT AGE GROUPS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA OF NO SPECIAL TYPE AND LYMPHATIC METASTASES

Davletova K.I.^a, Mikhaylova E.S.^{a, b}, Varaksin N.A.^c, Zhurakovskiy I.P.^{a, b}, Proskura A.V.^b, Sidorov S.V.^d, Autenshlyus A.I.^{a, b}

^a Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

^b Institute of Molecular Biology and Biophysics – subdivision of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

^c JSC “Vector-Best”, Novosibirsk, Russian Federation

^d Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to evaluate production of cytokines by the blood immune cells in patients of different age groups with invasive non-specified type mammary ductal carcinoma, with or without metastases. Production of cytokines by periphery blood immunocompetent cells, either spontaneous and stimulated with polyclonal activators, was assessed in 82 patients with invasive mammary ductal carcinoma. The concentrations of IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1ra, TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1 were determined by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. The patients were divided into 2 age groups: the first group consisted of 48 patients from 45 to 60 years old; the second group consisted of 34 older patients (61 to 75 years old). Metastases in local lymph nodes were documented in twenty patients from the first group and nine patients from the second group. The younger patients (45–60 years old) with metastases in local lymph nodes showed higher polyclonal activation index of IL-4 and IL-1ra production, when compared to the patients without lymphatic metastases. As for the older patients (61 to 75 years old), their polyclonal activation index of IL-6, IL-8, IL-1ra, G-CSF, GM-CSF production was significantly lower in cases of local lymph nodes metastases. The latter was due to higher level of spontaneous production, which suppressed the influence of polyclonal activators. The index of polyclonal activation upon production of cytokines in patients with lymphatic metastases was shown to be significantly higher for the age group of 45 to 60 years than in the age group of 61 to 75 years old. This fact suggested a highly stimulating effect of polyclonal activators in patients younger than 60 years. It was found that correlation between the index of polyclonal activation of cytokine production, and the indexes of ER, PR, HER2/NEU and Ki-67 receptor expression, which are used for the determination of molecular genetic subtype of the tumor, differ significantly for the distinct age groups.

Keywords: cytokines, blood immune cells, polyclonal activators, breast cancer, invasive ductal carcinoma of no special type, lymph nodes metastasis

Введение

Известно, что злокачественное новообразование молочной железы возникает у 12% женщин и нередко сопровождается лимфогенным метастазированием, которое является основной

причиной смерти у этих больных [7]. По данным метаанализа, 150 000 женщин, больных неметастатическим раком молочной железы, у 30% из них, даже на фоне адьювантной терапии, в дальнейшем развивались метастазы [4].

В настоящее время имеется большое количество данных, свидетельствующих о том, что снижение функции яичников в менопаузе связано со спонтанным увеличением провоспалительных цитокинов [14]. Наибольшее внимание уделяется IL-1, IL-6 и TNF α . Дефицит эстрогена повышает чувствительность клеток молочной железы к некоторым из этих цитокинов, особенно к IL-6, которая обусловлена увеличением количества рецепторов к цитокинам и усилением действия их кофакторов. Механизмы, с помощью которых эстроген вмешивается в активность цитокинов, до сих пор полностью неизвестны, но потенциально они могут включать взаимодействие эстрогена с другими факторами транскрипции, модулировать активность оксида азота, антиоксидантные эффекты, действие плазматической мембраны и функции иммунокомпетентных клеток [5, 14]. Кроме того, существуют убедительные доказательства связи стареющих клеток со злокачественной прогрессией опухолей. Из всех механизмов, связанных со старением, наибольшее внимание привлекает секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP), который проявляется в повышенной секреции цитокинов IL-6 и IL-8 [3]. Следовательно, изучение продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками крови с учетом возрастных особенностей у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа является актуальной проблемой.

Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками крови у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа в различных возрастных группах при наличии и отсутствии лимфогенного метастазирования.

Материалы и методы

Исследование было проведено на образцах периферической крови 82 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа, средний возраст которых составил 57 (от 46,0 до 75,0) лет. Учитывая тенденцию женщин к более позднему наступлению менопаузы [18], пациентки были разделены на две возрастные группы: первую группу составили 48 пациенток в возрасте от 45 до 60 лет, а вторую — 34 пациентки в возрасте от 61 до 75 лет. Метастазы в регионарные лимфатические узлы отмечались у 20 пациенток первой группы и у 9 пациенток второй. На основании проведенного иммуногистохимического исследования экспрессии рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR), второго рецептора фактора роста эпидермиса (HER2/NEU) и маркера пролиферации Ki-67

был определен молекулярно-генетический подтип опухоли. Неоадьювантная терапия ни одной из пациенток на момент исследования не проводилась.

Для оценки продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками (ИКК) крови применяли комплекс поликлональных активаторов (ПА), состоящий из фитогемагглютинаина в концентрации 4 мкг/мл, конканавалина А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарида в концентрации 2 мкг/мл. В исследовании использовали стандартизованный набор реагентов «Цитокин-стимул-бест» производства АО «Вектор-Бест». Одну часть клеток крови пациента инкубировали в питательной среде DMEM-F12 (для определения спонтанной продукции), а другую — в таком же объеме среды при 37 °С в течение 24 ч с комплексом ПА для определения индуцированной им продукции цитокинов, после чего клетки осаждали центрифугированием при 2000 об/мин 15 мин, получали супернатант, в котором определяли концентрацию IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1 α , TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1 с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов производства АО «Вектор-Бест».

Продукцию цитокинов ИКК крови оценивали по индексу влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию цитокинов ИКК крови, который высчитывали по формуле: ИВПА = А/Б, где А — концентрация цитокина в супернатанте после инкубации клеток крови с ПА, а Б — концентрация цитокина в супернатанте клеток крови без стимуляции ПА (спонтанная продукция). ИВПА выражали в условных единицах (у. е.). Такой подход нивелирует различия между содержанием ИКК в образцах периферической крови пациентов и дает возможность получать объективные данные, оценивающие способность продукции клеточных факторов, к которым относятся цитокины, то есть достигается их приведение к общему знаменателю.

Для статистической обработки результатов использовали программный пакет SPSS v. 17.0 for Windows. Для сравнения двух независимых групп использовали критерий Манна–Уитни. Рассчитывали коэффициент ранговой корреляции по Спирмену (r) и его достоверность (p). Полученные в ходе исследования данные представлены как медиана (Me) и интерквартильный размах (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Качество полученных результатов проверялось с помощью ROC-анализа.

Результаты и обсуждение

Исследование показало, что ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови у больных с на-

личием и отсутствием лимфогенного метастазирования в возрасте от 45 до 60 лет достоверно различались только по двум показателям: IL-4 и IL-1ra (табл. 1).

Как известно, IL-4 представляет собой плеiotропный цитокин, который в зависимости от своего происхождения может оказывать как активирующее (эндогенный по отношению к опухоли, продуцируемый клетками ее микроокружения), так и супрессирующее (экзогенный по отношению к опухоли, продуцируемый ИКК крови) влияние на злокачественное новообразование. IL-4, продуцируемый ИКК крови, обладает сильной противоопухолевой активностью, действуя как противоангиогенный фактор, ингибирующий выработку эндотелиальными клетками VEGF, как проапоптотический фактор, ингибирующий экспрессию белков PED, cFLIP, Bcl-xL, Bcl-2, и как противовоспалительный фактор, подавляющий синтез IL-1, TNF α и IL-6

и увеличивающий продукцию IL-1ra моноцитами и макрофагами [1, 11, 16]. По результатам наших исследований, при лимфогенном метастазировании ИВПА на продукцию IL-4 был более высокий, чем при отсутствии метастазирования, что свидетельствует о снижении его противовоспалительной функции, что также характерно и для IL-1ra.

IL-1ra является естественным рецепторным антагонистом IL-1 α и IL-1 β , регулирующим их биологические эффекты. IL-1ra супрессирует продукцию ангиогенных факторов, таких как VEGF и IL-8. Также IL-1ra оказывает антипролиферативную и антиметастатическую активность, в частности за счет уменьшения продукции IL-6, обусловленной действием TG2-зависимого механизма, который, в свою очередь, способствует переходу фенотипа люминальных клеток (эстрогензависимых) в базальные (эстроген-независимые), что является одним из механизмов,

ТАБЛИЦА 1. ИНДЕКСЫ ВЛИЯНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМОЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА В ВОЗРАСТЕ ОТ 45 ДО 60 ЛЕТ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) у. е.

TABLE 1. INDEXES OF POLYCLONAL ACTIVATORS INFLUENCE ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES BY BLOOD IMMUNE CELLS IN THE PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA NON-SPECIFIC TYPE AGED FROM 45 TO 60 YEARS OLD, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) c. u.

Цитокин Cytokine	С наличием метастазов With metastases n = 20	С отсутствием метастазов Without metastases n = 28	Достоверность различий (p) Probability value (p)
IL-2	9,28 (6,57-14,84)	7,43 (4,00-16,16)	0,140
IL-4	6,80 (3,50-8,30)	2,00 (1,30-4,30)	0,016*
IL-6	17,30 (8,33-71,00)	26,32 (6,03-58,78)	0,950
IL-8	10,14 (1,81-40,79)	5,59 (2,23-44,45)	0,770
IL-10	29,69 (16,28-87,88)	36,76 (11,45-77,20)	0,950
IL-17	61,28 (38,28-148,18)	41,60 (19,63-92,40)	0,202
IL-18	1,30 (1,15-1,49)	1,32 (1,18-1,60)	0,368
IL-1 β	20,81 (9,90-57,61)	24,75 (8,03-126,40)	0,572
IL-1ra	12,20 (8,22-16,40)	6,33 (4,65-10,93)	0,025*
TNF α	113,07 (49,71-330,03)	238,05 (44,88-443,83)	0,503
IFN γ	243,73 (108,64-688,91)	168,30 (79,38-538,99)	0,616
G-CSF	72,79 (30,08-151,46)	57,20 (18,58-149,07)	0,601
GM-CSF	14,52 (7,51-28,71)	14,40 (6,33-24,76)	0,738
VEGF	2,39 (1,78-3,07)	2,12 (1,15-3,02)	0,510
MCP-1	1,33 (0,67-4,20)	1,65 (1,03-3,66)	0,452

Примечание. * – различия достоверны.

Note. *, significant difference.

ТАБЛИЦА 2. ИНДЕКСЫ ВЛИЯНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМОЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА В ВОЗРАСТЕ ОТ 61 ДО 75 ЛЕТ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) у. е.

TABLE 2. INDEXES OF POLYCLONAL ACTIVATORS INFLUENCE ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES BY BLOOD IMMUNE CELLS IN THE PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA NON-SPECIFIC TYPE AGED FROM 61 TO 75 YEARS OLD, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) с. у.

Цитокин Cytokine	С наличием метастазов With metastases n = 9	С отсутствием метастазов Without metastases n = 25	Достоверность различий (p) Probability value (p)
IL-2	4,20 (1,58-12,43)	5,00 (3,05-9,10)	0,860
IL-4	1,30 (1,00-2,80)	2,10 (0,93-5,78)	0,685
IL-6	4,50 (1,05-17,42)	32,48 (18,51-350,03)	0,002*
IL-8	2,81 (1,05-5,80)	16,45 (5,47-42,75)	0,005*
IL-10	21,84 (5,50-70,25)	31,25 (13,42-49,00)	0,682
IL-17	7,80 (2,55-116,25)	22,55 (12,48-40,85)	0,234
IL-18	1,24 (1,17-1,60)	1,30 (1,10-1,42)	0,938
IL-1 β	13,76 (6,50-39,82)	47,83 (19,70-197,92)	0,053
IL-1ra	4,00 (2,35-6,10)	10,78 (6,51-13,74)	0,001*
TNF α	124,00 (11,03-287,70)	172,97 (53,44-291,09)	0,359
IFN γ	133,15 (11,00-445,15)	183,75 (76,20-439,90)	0,283
G-CSF	17,01 (3,60-64,55)	49,66 (21,82-323,07)	0,030*
GM-CSF	6,20 (4,63-10,25)	14,97 (8,20-27,18)	0,030*
VEGF	2,60 (1,35-3,38)	2,64 (2,08-4,09)	0,470
MCP-1	1,20 (0,74-1,50)	1,50 (0,63-2,52)	0,204

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

определяющих резистентность к таргетной терапии люминальных подтипов опухолей, что в конечном счете приводит к рецидивированию и метастазированию рака молочной железы [1, 10].

В таблице 2 представлены ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови у больных в возрасте от 61 до 75 лет. Достоверные различия были получены по ИВПА на продукцию IL-6, IL-8, IL-1ra, G-CSF и GM-CSF.

Сравнивая ИВПА на продукцию цитокинов у больных в возрасте 61-75 лет при наличии и отсутствии лимфогенного метастазирования, необходимо выделить наиболее значимые достоверные различия (p). Это, прежде всего, касается ИВПА на продукцию IL-8 и IL-1ra. Полученные данные показали, что при наличии лимфогенного метастазирования ИВПА на продукцию IL-8 в 78% случаев не превышает 4,00 у. е., а при его отсутствии — в 80% выше 4,10 у. е. (p = 0,0008 по угловому критерию Фишера). Аналогичные

результаты получены и для ИВПА на продукцию IL-1ra: при наличии лимфогенного метастазирования в 78% случаев его значение не превышает 6,00 у. е., а в 84% при отсутствии метастазирования — выше 6,10 у. е. (p = 0,0003 по угловому критерию Фишера). Таким образом, полученные значения ИВПА на продукцию ИКК крови IL-8 и IL-1ra можно использовать для определения вероятности лимфогенного метастазирования. Еще раз отметим, что это касается только пациенток в возрасте 61-75 лет.

IL-6, являясь плеiotропным цитокином, может оказывать как провоспалительное, так и противовоспалительное действие на опухоль, однако механизмы, от которых зависят биологические эффекты данного цитокина, еще не полностью известны [12]. IL-8, как провоспалительный цитокин, наряду с IL-6 является одним из основных компонентов секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP). Также

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ROC-АНАЛИЗА МОДЕЛИ ЛИМФОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ИНДЕКСА ВЛИЯНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМОЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА

TABLE 3. RESULTS OF THE ROC-ANALYSIS OF THE MODEL OF LYMPHATIC METASTASIS BASED ON THE INDEX OF INFLUENCE OF POLYCLONAL ACTIVATORS ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES BY IMMUNE BLOOD CELLS IN PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA NON-SPECIFIC TYPE

В возрасте от 45 до 60 лет In the age from 45 to 60 years old		В возрасте от 61 до 75 лет In the age from 61 to 75 years old	
Цитокин Cytokine	Площадь под кривой Area under curve	Цитокин Cytokine	Площадь под кривой Area under curve
IL-4	0,748	IL-6	0,820
IL-1ra	0,624	IL-8	0,799
		IL-1ra	0,879
		G-CSF	0,736
		GM-CSF	0,732

Примечание. 0,9-1 – отличное качество модели; 0,8-0,9 – очень хорошее качество модели; 0,7-0,8 – хорошее качество модели; 0,6-0,7 – среднее качество модели; 0,5-0,6 – неудовлетворительное качество модели.

Note. 0.9-1, perfect model; 0.8-0.9, very good model; 0.7-0.8, good model; 0.6-0.7, adequate model; 0.5-0.6, unsatisfactory model.

известно, что эстроген может подавлять продукцию IL-6 и IL-8 клетками рака молочной железы, что объясняет появление достоверных различий ИВПА на продукцию этих цитокинов лишь в старшей возрастной группе, что обусловлено уменьшением гормонпродуцирующей функции яичников в постменопаузальном периоде [3, 14].

У больных в возрасте до 60 лет не было получено достоверных различий по ИВПА на продукцию IL-6 и IL-8 при наличии и отсутствии лимфогенного метастазирования, в то время как у больных в возрасте от 61 до 75 лет данные различия появились. Полученные результаты связаны с более высоким уровнем спонтанной продукции цитокинов ИКК крови, при которой действие ПА снижается, то есть ИКК крови, продуцируя в кондиционную среду значительное количество цитокинов, более слабо реагируют на ПА. При отсутствии лимфогенного метастазирования спонтанная продукция имела более низкий уровень концентрации цитокина, что привело к более высокому значению ИВПА, отражающему стимулирующий эффект ПА. Полученная закономерность была характерна для IL-1ra и колоние-стимулирующих факторов – G-CSF и GM-CSF.

Известно, что, подобно другим цитокинам, роль CSF в патогенезе злокачественных новообразований неоднозначна – это может быть как стимуляция канцерогенеза, так и оказание туморсупрессивного эффекта. Эндогенные по отношению к опухоли G-CSF и GM-CSF могут стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 и TNF α , а экзогенные, наоборот, подавлять ее. Продукция самих CSF

возрастает под влиянием IL-1, IL-6 и TNF α , что лежит в основе механизмов саморегуляции [2]. Экзогенный GM-CSF замедляет рост опухоли, оказывая противоангиогенный эффект, посредством секретируемого растворимого рецептора-1 VEGF (sVEGFR-1), который связывает и инактивирует VEGF [15]. Также стоит отметить возрастные изменения сигнальных путей, в результате которых снижаются биологические эффекты G-CSF и GM-CSF на опухоль, что в конечном счете замедляет ее прогрессию. Это происходит за счет повышенной активности ингибиторных молекул, таких как тирозиновая протеин-фосфатаза-1 (SHP-1) и белков-супрессоров цитокиновой сигнализации (SOCS), отвечающих за возрастную неспособность G-CSF и GM-CSF стимулировать функции нейтрофилов, посредством ингибирования PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK и JAK-STAT сигнальных путей [17].

Качество полученных результатов ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови у больных в различных возрастных группах при наличии и отсутствии лимфогенного метастазирования, определенных с помощью ROC-анализа, представлено в таблице 3.

Результаты ROC-анализа, который основан на определении чувствительности и специфичности полученных данных, свидетельствуют не только о существенных различиях между исследуемыми возрастными группами, но и о возможности оценить вероятность лимфогенного метастазирования по значениям ИВПА на продукцию IL-6 и IL-1ra в возрастной группе 61-75 лет. Что касается пациенток в возрасте 45-60 лет,

ТАБЛИЦА 4. ИНДЕКСЫ ВЛИЯНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМОЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА ПРИ ЛИМФОГЕННОМ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) у. е.

TABLE 4. INDEXES OF POLYCLONAL ACTIVATORS INFLUENCE ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES BY BLOOD IMMUNE CELLS IN THE PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA NON-SPECIFIC TYPE WITH LYMPHATIC METASTASES, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) c. u.

Цитокин Cytokine	В возрасте от 45 до 60 лет In the age from 45 to 60 years old n = 20	В возрасте от 61 до 75 лет In the age from 61 to 75 years old n = 9	Достоверность различий (p) Probability value (p)
IL-2	9,28 (6,57-14,84)	4,20 (1,58-12,43)	0,053
IL-4	6,80 (3,50-8,30)	1,30 (1,00-2,80)	0,009*
IL-6	17,30 (8,33-71,00)	4,50 (1,05-17,42)	0,043*
IL-8	10,14 (1,81-40,79)	2,81 (1,05-5,80)	0,094
IL-10	29,69 (16,28-87,88)	21,84 (5,50-70,25)	0,203
IL-17	61,28 (38,28-148,18)	7,80 (2,55-116,25)	0,048*
IL-18	1,30 (1,15-1,49)	1,24 (1,17-1,60)	0,944
IL-1 β	20,81 (9,90-57,61)	13,76 (6,50-39,82)	0,540
IL-1ra	12,20 (8,22-16,40)	4,00 (2,35-6,10)	0,001*
TNF α	113,07 (49,71-330,03)	124,00 (11,03-287,70)	0,396
IFN γ	243,73 (108,64-688,91)	113,15 (11,00-445,15)	0,172
G-CSF	72,79 (30,08-151,46)	17,01 (3,60-64,55)	0,073
GM-CSF	14,52 (7,51-28,71)	6,20 (4,63-10,25)	0,016*
VEGF	2,39 (1,78-3,07)	2,60 (1,35-3,38)	0,850
MCP-1	1,33 (0,67-4,20)	1,20 (0,74-1,50)	0,494

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 5. ИНДЕКСЫ ВЛИЯНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМОЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА БЕЗ ЛИМФОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) у. е.

TABLE 5. INDEXES OF POLYCLONAL ACTIVATORS INFLUENCE ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES BY BLOOD IMMUNE CELLS IN THE PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA NON-SPECIFIC TYPE WITHOUT LYMPHATIC METASTASES, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) c. u.

Цитокин Cytokine	В возрасте от 45 до 60 лет In the age from 45 to 60 years old n = 28	В возрасте от 61 до 75 лет In the age from 61 to 75 years old n = 25	Достоверность различий (p) Probability value (p)
IL-2	7,43 (4,00-16,16)	5,00 (3,05-9,10)	0,123
IL-4	2,00 (1,30-4,30)	2,10 (0,93-5,78)	0,896
IL-6	26,32 (6,03-58,78)	32,48 (18,51-350,03)	0,121
IL-8	5,59 (2,23-44,45)	16,45 (5,47-42,75)	0,310
IL-10	36,76 (11,45-77,20)	31,25 (13,42-49,00)	0,354
IL-17	41,60 (19,63-92,40)	22,55 (12,48-40,85)	0,098
IL-18	1,32 (1,18-1,60)	1,30 (1,10-1,42)	0,318
IL-1 β	24,75 (8,03-126,40)	47,83 (19,70-197,92)	0,240
IL-1ra	6,33 (4,65-10,93)	10,78 (6,51-13,74)	0,064
TNF α	238,05 (44,88-443,83)	172,97 (53,44-291,09)	0,643
IFN γ	168,30 (79,33-538,99)	183,75 (76,20-439,90)	0,735
G-CSF	57,20 (18,58-149,07)	49,66 (21,82-323,07)	0,383
GM-CSF	14,40 (6,33-24,76)	14,96 (8,20-27,18)	0,845
VEGF	2,12 (1,15-3,02)	2,64 (2,08-4,09)	0,057
MCP-1	1,65 (1,02-3,66)	1,50 (0,63-2,52)	0,482

ТАБЛИЦА 6. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ ИНДЕКСА ВЛИЯНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ С ЭКСПРЕССИЕЙ КЛЕТКАМИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА РЕЦЕПТОРОВ ER, PR, HER2/NEU И МАРКЕРА ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67

TABLE 6. CORRELATION BETWEEN INDEX OF POLYCLONAL ACTIVATORS INFLUENCE ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES BY BLOOD IMMUNE CELLS AND THE EXPRESSION OF ER, PR, HER2/NEU AND PROLIFERATION MARKER Ki-67 RECEPTORS BY THE CELLS OF INVASIVE DUCTAL CARCINOMA NON-SPECIFIC TYPE

В возрасте от 45 до 60 лет In the age from 45 to 60 years old n = 48		В возрасте от 61 до 75 лет In the age from 61 to 75 years old n = 34	
Исследуемые параметры Researched parameters	Коэффициент корреляции r (p) Correlation coefficient r (p)	Исследуемые параметры Researched parameters	Коэффициент корреляции r (p) Correlation coefficient r (p)
ER – ИВПА IFN γ ER – IPAI IFN γ	0,397 (0,005)	ER – ИВПА IL-10 ER – IPAI IL-10	0,480 (0,006)
HER2/NEU – ИВПА IL-10 HER2/NEU – IPAI IL-1	-0,458 (0,001)	PR – ИВПА IL-10 PR – IPAI IL-10	0,395 (0,028)
HER2/NEU – ИВПА TNF α HER2/NEU – IPAI TNF α	-0,620 (0,000003)	HER2/NEU – ИВПА IL-6 HER2/NEU – IPAI IL-6	0,515 (0,003)
HER2/NEU – ИВПА MCP-1 HER2/NEU – IPAI MCP-1	-0,435 (0,002)	HER2/NEU – ИВПА IL-8 HER2/NEU – IPAI IL-8	0,421 (0,018)
		HER2/NEU – ИВПА IL-1ra HER2/NEU – IPAI IL-1ra	0,421 (0,018)
		Ki-67 – ИВПА IL-18 Ki-67 – IPAI IL-18	-0,397 (0,027)

ТАБЛИЦА 7. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ ИНДЕКСА ВЛИЯНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ С ЭКСПРЕССИЕЙ КЛЕТКАМИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА РЕЦЕПТОРОВ ER, PR, HER2/NEU И МАРКЕРА ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67 ПРИ ЛИМФОГЕННОМ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ

TABLE 7. CORRELATION BETWEEN INDEX OF POLYCLONAL ACTIVATORS INFLUENCE ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES BY BLOOD IMMUNE CELLS AND THE EXPRESSION OF ER, PR, HER2/NEU AND PROLIFERATION MARKER Ki-67 RECEPTORS BY THE CELLS OF INVASIVE DUCTAL CARCINOMA NON-SPECIFIC TYPE WITH LYMPHATIC METASTASES

В возрасте от 45 до 60 лет In the age from 45 to 60 years old n = 20		В возрасте от 61 до 75 лет In the age from 61 to 75 years old n = 9	
Исследуемые параметры Researched parameters	Коэффициент корреляции r (p) Correlation coefficient r (p)	Исследуемые параметры Researched parameters	Коэффициент корреляции r (p) Correlation coefficient r (p)
Ki-67 – ИВПА IL-2 Ki-67 – IPAI IL-2	0,458 (0,042)	ER – ИВПА IFN γ ER – IPAI IFN γ	0,756 (0,030)
Ki-67 – ИВПА IL-10 Ki-67 – IPAI IL-10	-0,689 (0,001)	PR – ИВПА IL-8 PR – IPAI IL-8	0,779 (0,023)
		HER2/NEU – ИВПА IL-6 HER2/NEU – IPAI IL-6	0,873 (0,005)
		HER2/NEU – ИВПА VEGF HER2/NEU – IPAI VEGF	0,736 (0,037)

то судить о вероятности лимфогенного метастазирования в этой группе сложнее.

Сравнивая ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови у больных в различных возрастных

группах при лимфогенном метастазировании, необходимо отметить, что у пациенток в возрасте 45-60 лет значение ИВПА превышало таковое у больных в возрасте 61-75 лет (табл. 4).

Полученные данные свидетельствуют о высоком стимулирующем эффекте ПА на продукцию цитокинов ИКК крови у пациенток в возрасте 45-60 лет. То есть с возрастом способность ИКК крови реагировать на ПА снижается, что может лежать в основе замедленного прогрессирования злокачественного новообразования, исходя из представлений о способности иммунной системы стимулировать опухолевую прогрессию [1, 8]. Об этом также свидетельствует полученная прямая корреляционная связь в возрастной группе 45-60 лет между количеством лимфатических узлов с метастазами и относительным содержа-

нием низкодифференцированных клеток опухоли ($r = 0,315$; $p = 0,039$) и обратная корреляционная связь между количеством лимфатических узлов с метастазами и относительным содержанием высокодифференцированных клеток опухоли ($r = -0,379$; $p = 0,039$) у пациенток в возрасте 61-75 лет.

В отличие от данных таблицы 3, у больных без лимфогенного метастазирования не было получено достоверных различий среди сравниваемых возрастных групп по ИВПА на продукцию цитокинов, что в очередной раз подчеркивает роль клеточных факторов ИКК крови в лимфогенном

ТАБЛИЦА 8. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ ИНДЕКСА ВЛИЯНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ С ЭКСПРЕССИЕЙ КЛЕТКАМИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА РЕЦЕПТОРОВ ER, PR, HER2/NEU И МАРКЕРА ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67 ПРИ ОТСУТСТВИИ ЛИМФОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

TABLE 8. CORRELATION BETWEEN INDEX OF POLYCLONAL ACTIVATORS INFLUENCE ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES BY BLOOD IMMUNE CELLS AND THE EXPRESSION OF ER, PR, HER2/NEU AND PROLIFERATION MARKER Ki-67 RECEPTORS BY THE CELLS OF INVASIVE DUCTAL CARCINOMA NON-SPECIFIC TYPE WITHOUT LYMPHATIC METASTASES

В возрасте от 45 до 60 лет In the age from 45 to 60 years old n = 28		В возрасте от 61 до 75 лет In the age from 61 to 75 years old n = 25	
Исследуемые параметры Researched parameters	Коэффициент корреляции r (p) Correlation coefficient r (p)	Исследуемые параметры Researched parameters	Коэффициент корреляции r (p) Correlation coefficient r (p)
ER – ИВПА IFN γ ER – IPAI IFN γ	0,446 (0,017)	ER – ИВПА IL-10 ER – IPAI IL-10	0,446 (0,033)
PR – ИВПА GM-CSF PR – IPAI GM-CSF	0,394 (0,038)		
HER2/NEU – ИВПА IL-10 HER2/NEU – IPAI IL-1	-0,554 (0,002)		
HER2/NEU – ИВПА TNF α HER2/NEU – IPAI TNF α	-0,607 (0,001)		
HER2/NEU – ИВПА G-CSF HER2/NEU – IPAI G-CSF	-0,391 (0,040)		
HER2/NEU – ИВПА GM-CSF HER2/NEU – IPAI GM-CSF	-0,482 (0,009)		
HER2/NEU – ИВПА MCP-1 HER2/NEU – IPAI MCP-1	-0,442 (0,019)		
Ki-67 – ИВПА GM-CSF Ki-67 – IPAI GM-CSF	-0,473 (0,011)		
Ki-67 – ИВПА MCP-1 Ki-67 – IPAI MCP-1	-0,403 (0,033)		

метастазировании инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (табл. 5).

Известно, что цитокины могут стимулировать, ингибировать или же не оказывать никакого влияния на пролиферацию и дифференцировку клеток, в зависимости от типа клеток, на которые они воздействуют [1]. Опухоли молочной железы являются крайне гетерогенными гормонозависимыми новообразованиями, что обуславливает наличие различных молекулярно-генетических подтипов, основанных на определении экспрессии рецепторов ER, PR, HER2/NEU и маркера пролиферации Ki-67. Таким образом, каждый молекулярно-генетический подтип опухоли может по-разному взаимодействовать с иммунной системой и продуцировать определенный профиль цитокинов, который оказывает различное влияние на опухолевую прогрессию [9, 13]. Исследуя корреляционные связи ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови с экспрессией рецепторов ER, PR, HER2/NEU и Ki-67, удалось установить, что в различных возрастных группах корреляционные связи исследуемых ИГХ-маркеров с цитокинами существенно отличаются (табл. 6).

Более сильная обратная корреляционная связь отмечалась у пациенток в возрасте 45-60 лет между экспрессией рецептора HER2/NEU и ИВПА на продукцию TNF α , что обусловлено высокой спонтанной продукцией TNF α ИКК крови. Что же касается пациенток в возрасте 61-75 лет, то более высокая прямая корреляционная связь отмечалась между экспрессией рецептора HER2/NEU и ИВПА на продукцию IL-6, что, с одной стороны, свидетельствовало о низкой спонтанной продукции данного цитокина ИКК крови, а с другой — о стимулирующем эффекте ПА.

При изучении функциональной активности ИКК крови при лимфогенном метастазировании также не найден интегральный показатель корреляционных связей у пациентов различных возрастных групп (табл. 7).

Более высокая обратная корреляционная связь отмечалась между экспрессией маркера пролиферации Ki-67 и ИВПА на продукцию IL-10 у пациенток в возрасте 45-60 лет. Можно предположить, что противовоспалительная функция IL-10 в определенной мере препятствует пролиферативной активности опухолевых клеток. Что же касается пациенток более старшей возрастной группы, то она характеризовалась достаточно сильными корреляционными связями между выраженностью ИГХ-маркеров и ИВПА на продукцию следующих цитокинов: IFN γ , IL-8, IL-6 и VEGF, функции которых способствуют опухолевой прогрессии. В частности, IFN γ не только играет ключевую роль в противоопухолевом иммунитете, обладая антипролиферативным и про-

апоптозным действием, что в некоторой степени обеспечивает отбор и выживание более злокачественных опухолевых клеток, но и способствует уклонению опухоли от иммунного надзора, а также онко- и ангиогенезу, за счет усиления экспрессии толерантных молекул и запуска программы гомеостаза [1, 6].

У пациенток без лимфогенного метастазирования также сохраняются существенные различия по корреляционным связям между выраженностью ИГХ-маркеров и ИВПА на продукцию цитокинов в исследуемых возрастных группах (табл. 8).

В большинстве случаев у пациенток в возрасте 45-60 лет встречаются обратные корреляционные связи между ИГХ-маркерами и ИВПА на продукцию цитокинов, обладающих как про-, так и противовоспалительными эффектами.

При исследовании связи молекулярно-генетических подтипов с возрастом пациенток и наличием у них лимфогенного метастазирования достоверные различия были получены лишь в группе пациенток с люминальным В HER2/NEU⁺ подтипом ($p = 0,021$). Так, у пациенток с лимфогенным метастазированием в возрасте 45-60 лет данный люминальный подтип встречался в 50% случаев, в то время как у пациенток в возрасте 61-75 лет в 12,5%.

Таким образом, из всего массива полученных результатов исследования можно выделить следующее:

1. Взаимосвязь между возрастными показателями больных и ИВПА на продукцию цитокинов.
2. При наличии метастазов в лимфатических узлах у пациенток в возрасте 45-60 лет повышается ИВПА только на продукцию IL-4 и IL-1ra, что является особенностью ИКК крови этой возрастной группы.
3. Особенностью пациенток в возрасте 61-75 лет при наличии метастазов в регионарных лимфатических узлах является достоверное снижение ИВПА на продукцию IL-6, IL-8, IL-1ra, G-CSF, GM-CSF. Представлены значения ИВПА на продукцию IL-8 и IL-1ra, которые могут служить в 78% случаев диагностическим критерием лимфогенного метастазирования.
4. Значение площади под кривой в ROC-анализе подтверждает не только наличие существенных различий по ИВПА на продукцию цитокинов в возрастных группах, но и позволяет связать их с лимфогенным метастазированием.
5. Отмечается специфика в корреляционных связях между ИВПА на продукцию цитокинов и ИГХ-маркерами в различных возрастных группах у пациенток с наличием и отсутствием лимфогенного метастазирования.

Список литературы / References

1. Соснина А.В., Великая Н.В., Варакин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. Новосибирск: Офсет, 2014. 128 с. [Sosnina A.V., Velikaya N.V., Varaksin N.A., Grishaev M.P., Autenshlyus A.I. The role of cytokines in the pathogenesis of malignant neoplasms]. Novosibirsk: Ofset, 2014. 128 p.
2. Cetean S., Căinap C., Constantin A., Căinap S., Gherman A., Oprean L., Hangan A., Oprean R. The importance of the granulocyte-colony stimulating factor in oncology. *Clujul Med.*, 2015, Vol. 88, no. 4, pp. 468-472.
3. Coppé J., Desprez P., Krtolica A., Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.*, 2010, Vol. 5, pp. 99-118.
4. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 2005, Vol. 365, no. 1687, p. 717.
5. Gameiro C.M., Romão F., Castelo-Branco C. Menopause and aging: changes in the immune system – a review. *Maturitas*, 2010, Vol. 67, no. 4, p. 316.
6. García-Tuñón I., Ricote M., Ruiz A.A., Fraile B., Paniagua R., Royuela M. Influence of IFN-gamma and its receptors in human breast cancer. *BMC Cancer*, 2007, Vol. 7, p. 158.
7. Giordano S.B., Gradishar W. Breast cancer: updates and advances in 2016. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2017, Vol. 29, no. 1, pp. 12-17.
8. Gonzalez H., Hagerling C., Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes and Dev.*, 2018, Vol. 32, no. 19-20, pp. 1267-1284.
9. Herrera A.C., Panis C., Victorino V.J., Campos F.C., Colado-Simão A.N., Cecchini A.L., Cecchini R. Molecular subtype is determinant on inflammatory status and immunological profile from invasive breast cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 11, pp. 2193-201.
10. Keunhee O., Ok-Young L., Yeonju P., Myung W.S., Dong-Sup L. IL-1 β induces IL-6 production and increases invasiveness and estrogen-independent growth in a TG2-dependent manner in human breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2016, Vol. 16, no. 1, p. 724.
11. Li Z., Jiang J., Wang Z., Zhang J., Xiao M., Wang C., Lu Y., Qin Z. Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. *Cancer Res.*, 2008, Vol. 68, no. 21, p. 94.
12. Mauer J., Denson J.L., Brüning J.C. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 2, pp. 92-101.
13. Nagini S. Breast cancer: current molecular therapeutic targets and new players. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2017, Vol. 17, no. 2, pp. 152-163.
14. Pfeilschifter J., Köditz R., Pfoh M., Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr. Rev.*, 2002, Vol. 23, no. 1, pp. 90-119.
15. Szomolay B., Eubank T.D., Roberts R.D., Marsh C.B., Friedman A. Modeling the inhibition of breast cancer growth by GM-CSF. *J. Theor. Biol.*, 2012, Vol. 303, no. 141 p. 51.
16. Todaro M., Lombardo Y., Francipane M.G., Alea M.P., Cammareri P., Iovino F., Di Stefano A.B., di Bernardo C., Agrusa A., Condorelli G., Walczak H., Stassi G. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death Differ.*, 2008, Vol. 4, no. 762, p. 72.
17. Tortorella C., Simone O., Piazzolla G., Stella I., Antonaci S. Age-related impairment of GM-CSF-induced signalling in neutrophils: role of SHP-1 and SOCS proteins. *Ageing Res. Rev.*, 2007, Vol. 6, no. 2, pp. 81-93.
18. Yazdkhasti M., Tourzani Z.M., Roozbeh N., Hasanpour V., Saeieh S.E., Abdi F. The association between diabetes and age at the onset of menopause: a systematic review protocol. *Syst. Rev.*, 2019, Vol. 8, no. 1, p. 80.

Авторы:

Давлетова К.И. — младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Михайлова Е.С. — научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» — структурное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Davletova K.I., Junior Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Mikhaylova E.S., Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics — subdivision of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Вараксин Н.А. — заведующий лабораторией
АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Жураковский И.П. — д.м.н., ведущий научный
сотрудник центральной научно-исследовательской
лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ; старший научный
сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский
институт молекулярной биологии и биофизики» —
структурное подразделение ФГБНУ «Федеральный
исследовательский центр фундаментальной и
трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Проскура А.В. — к.м.н., научный сотрудник ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт молекулярной
биологии и биофизики» — структурное подразделение
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
фундаментальной и трансляционной медицины»,
г. Новосибирск, Россия

Сидоров С.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой
хирургических болезней ФГБОУ ВО «Новосибирский
национальный исследовательский государственный
университет», г. Новосибирск, Россия

Аутеншлюс А.И. — д.б.н., профессор, заведующий
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ; главный научный сотрудник
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
молекулярной биологии и биофизики» — структурное
подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский
центр фундаментальной и трансляционной медицины»,
г. Новосибирск, Россия

Varaksin N.A., Head of Laboratory, JSC “Vector-Best”,
Novosibirsk, Russian Federation

Zhurakovsky I.P., PhD, MD (Medicine), Leading Research
Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State
Medical University; Senior Research Associate, Institute of
Molecular Biology and Biophysics — subdivision of Federal
Research Center of Fundamental and Translational Medicine,
Novosibirsk, Russian Federation

Proskura A.V., PhD (Medicine), Research Associate, Institute
of Molecular Biology and Biophysics — subdivision of Federal
Research Center of Fundamental and Translational Medicine,
Novosibirsk, Russian Federation

Sidorov S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Surgery
Department, Novosibirsk State University, Novosibirsk,
Russian Federation

Autenshlyus A.I., PhD, MD (Biology), Professor, Head,
Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical
University; Main Research Associate, Institute of Molecular
Biology and Biophysics — subdivision of Federal Research
Center of Fundamental and Translational Medicine,
Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 16.05.2019
Принята к печати 27.05.2019

Received 16.05.2019
Accepted 27.05.2019

ФЕНОТИП ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ НЕОПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ

Абакумова Т.В.¹, Генинг Т.П.¹, Долгова Д.Р.¹, Антонеева И.И.^{1,2},
Песков А.Б.¹, Генинг С.О.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

² ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

Резюме. На сегодня отсутствует единая точка зрения на роль циркулирующих нейтрофилов (Нф) в механизмах возникновения и развития неоплазмы. Считается, что вследствие высокой функциональной пластичности они могут проявлять как про-, так и противоопухолевую активность. С целью изучения фенотипа Нф на различных стадиях неоплазии шейки матки оценивали абсолютное и относительное их количество, активность миелопероксидазы, показатели спонтанного и индуцированного НСТ-теста, уровень катионных белков. В лизате Нф и сыворотке крови оценивали спонтанную продукцию эластазы и активных форм матриксных металлопротеиназ, уровень IL-2, IL-8, IL-18, IFN γ , G-CSF. Образование внеклеточных ловушек (NET) оценивали с суточной культурой *Saccharomyces cerevisiae* в качестве индуктора. Обследована 31 пациентка с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (CIN) и 21 первичная больная раком шейки матки (РШМ) Ia стадии по FIGO, а также 25 практически здоровых женщин. Установлена повышенная по сравнению с нормой спонтанная и индуцированная кислородзависимая цитолитическая и фагоцитарная активность и спонтанная продукция NET на фоне снижения абсолютного количества Нф у пациенток с CIN, что позволяет предполагать их противоопухолевую активность. Уже на стадии дисплазии как в Нф, так и в плазме крови возрастают по сравнению с нормой уровни «проопухолевых» цитокинов, ММП-9, IL-2 и G-CSF. Высокие уровни в плазме крови регуляторного IFN γ и праймирующего активацию нейтрофилов IL-8 не предполагают использования на стадии дисплазии шейки матки экзогенных стимуляторов активности Нф. На начальной стадии РШМ значимо по сравнению с нормой увеличено абсолютное количество Нф. Однако на фоне повышенной спонтанной кислородзависимой цитолитической активности у них значимо снижена активность фагоцитоза и резко повышена спонтанная продукция NET, что в целом характерно для «проопухолевого» фенотипа Нф. В Нф и плазме крови больных РШМ Ia сохраняется повышенным уровень IL-2 и продолжает возрастать уровень ММП-9. Таким образом, полученные результаты позволяют предполагать изменение фенотипа Нф при переходе от дисплазии к РШМ в сторону увеличения проопухолевых клеток низкой плотности. Полученные результаты позволили разработать алгоритм обследования женщин с подозрением на РШМ, включающий определение IL-2 в сыворотке крови и ММП-9 в лизате Нф.

Ключевые слова: цервикальная интраэпителиальная неоплазия, рак шейки матки, нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки, цитокины, металлопротеиназы

Адрес для переписки:

Генинг Татьяна Петровна
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»
432017, Россия, г. Ульяновск,
ул. Архитектора Ливчака, 2.
Тел.: 8 (8422) 32-70-71.
E-mail: naum-53@yandex.ru

Address for correspondence:

Gening Tatyana P.
Ulyanovsk State University
432017, Russian Federation, Ulyanovsk, Arch. Livchak str., 2.
Phone: 7 (8422) 32-70-71.
E-mail: naum-53@yandex.ru

Образец цитирования:

Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, Д.Р. Долгова, И.И. Антонеева, А.Б. Песков, С.О. Генинг «Фенотип циркулирующих нейтрофилов на разных стадиях неоплазии шейки матки» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1127-1138.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138
© Абакумова Т.В. и соавт., 2019

For citation:

T.V. Abakumova, T.P. Gening, D.R. Dolgova, I.I. Antoneeva, A.B. Peskov, S.O. Gening "Phenotype of circulating neutrophils at different stages of cervical neoplasia", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1127-1138.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138

PHENOTYPE OF CIRCULATING NEUTROPHILS AT DIFFERENT STAGES OF CERVICAL NEOPLASIA

Abakumova T.V.^a, Gening T.P.^a, Dolgova D.R.^a, Antoneeva I.I.^{a, b},
Peskov A.B.^a, Gening S.O.^{a, b}

^a Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

^b Regional Center of Clinical Oncology, Ulyanovsk, Russian Federation

Abstract. At the present time, there is no common point of view to the role of circulating neutrophils (NP) in emergence and development of neoplasia. It is suggested that due to high functional plasticity, the neutrophils may exhibit both pro- and antitumor activity. In order to study the NP phenotype at different stages of cervical neoplasia (CN), we have evaluated their absolute and relative amounts, myeloperoxidase activity, spontaneous and induced NST-test markers, and the level of intracellular cationic proteins. Spontaneous production of elastase and active forms of matrix metalloproteinases, the levels of IL-2, IL-8, IL-18, IFN γ , G-CSF were determined in the NP cell lysates and in blood serum. The formation of extracellular traps (NET) was evaluated using 1-day cultures of *Saccharomyces cerevisiae* as an inducer. We examined 31 patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 21 primary patients with cervical cancer (CC, Ia stage according to FIGO scale), as well as 25 practically healthy women. We revealed increased spontaneous and inducible oxygen-dependent cytolytic and phagocytic activity and spontaneous production of NET if compared to normal values, along with decreased absolute NP numbers in patients with CIN, thus suggesting the antitumor activity of NP. The levels of “pro-tumor” cytokines (MMP-9, IL-2 and G-CSF) become increased over normal levels as early as at the CIN stage, both for the neutrophils and blood plasma. High levels of regulatory IFN γ and neutrophil-priming IL-8 in blood plasma do not presume any use of exogenous NP-activating factors at the stage of cervical dysplasia. At the initial stage of cervical cancer, the absolute NP amounts are significantly increased compared to normal counts. However, despite increased spontaneous oxygen-dependent cytolytic activity, the NPs have a significantly reduced activity of phagocytosis and sharply increased spontaneous production of NET, thus, generally, being characteristic to the “pro-tumorous” NP phenotype. IL-2 levels are elevated, and MMP-9 values are still increased in NP and blood plasma of patients with CC (stage Ia). Hence, the obtained results suggest some changes of NP phenotype to a pro-tumorous pattern during transition from intraepithelial dysplasia to cervical cancer. These results allowed us to design an algorithm for examining women with suspected cervical cancer, including IL-2 measurement in blood serum, and MMP-9 amounts in the NP lysates.

Keywords: cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer, neutrophils, neutrophilic extracellular traps, cytokines, metalloproteinases

Введение

Солідные клинические исследования показали, что количество нейтрофилов (Нф) и их функциональное состояние в периферической крови изменяются у пациентов со злокачественными опухолями и при ряде локализаций эти изменения могут иметь прогностическое значение [23, 48, 56]. Нф сегодня рассматриваются как одна из основных популяций клеток-эффекторов, осуществляющих противоопухолевую защиту [21, 59]. Постулируется существование нескольких основных пулов Нф: циркулирующий и пристеночный, тканевой, слюиварный и костномозговой [7]. Нф циркулируют в крови порядка 6-10 часов и далее перемещаются в ткани. Показано, что Нф в периферической крови и тканях способны к изменению метаболизма, экспрессии ряда генов, цитокинов, адгезионных молекул и рецепторов.

При этом, обладая высокой функциональной пластичностью, они могут проявлять как про-, так и противоопухолевую активность. С одной стороны, это подтвержденное *in vitro*, прямое цитотоксическое и цитостатическое действие Нф на клетки опухоли [30]. Они разрушают трансформированные и опухолевые клетки, используя антимикробное и цитотоксическое содержимое гранул. Однако механизмы цитотоксичности Нф еще недостаточно изучены. Возможно, это связано с коротким периодом полувыведения и нестабильностью этих механизмов. Исследования *in vivo* позволили предположить формирование зон плотного контакта (цитотоксических синапсов) между мишенью и миелоидными клетками для последующей элиминации опухоли [42, 59]. Нф накапливаются в зонах интенсивного роста опухоли и блокируют диффузию опухолевых кле-

ток [15]. Цитокины, хемокины и факторы роста, секретируемые нейтрофилами, могут привлекать и активировать клетки врожденного и адаптивного иммунитета, то есть вызывать косвенный противоопухолевый эффект [14, 35]. Нф участвуют в патогенезе внеклеточно, выделяя мощные противомикробные вещества и протеазы либо образуя внеклеточные ловушки (NETs) [34]. NET выделяются активированными Нф в ответ на аутоиммунные стимулы, инфекционные агенты, асептическое воспаление и рак. При этом мембрана ядра распадается, хроматин деконденсируется и белки из нейтрофильных гранул (лактоферин, миелопероксидаза (МПО)) и гистоны ядра связываются с деконденсированной ДНК, и вся структура выбрасывается из клетки. Показано, что NETs захватывают, но не убивают микробы [38]. При этом продлевается выживаемость Нф, выбрасывающих ловушки [60]. В то же время многочисленные исследования показывают, что неконтролируемое, чрезмерное высвобождение или неадекватное удаление NET способствует развитию ряда патологических состояний [41]. На сегодня нет единой точки зрения относительно роли NET в канцерогенезе. Работами Долгушина И.И. и соавт. [4] показано, что механизм образования NET обладает специфичностью, что может быть связано с преактивацией «праймирования» нейтрофилов собственными опухолевыми клетками. Полагают, что NET могут реализовать противоопухолевые эффекты, уничтожая опухолевые клетки либо активируя иммунную систему [13]. NETs могут убить активированную эндотелиальную клетку, повреждать кровеносные сосуды опухоли [28, 45]. В то же время показано, что NET захватывают циркулирующие опухолевые клетки, что приводит к увеличению их адгезии, образованию микро- и макрометастазов [20]. Показано, что нейтрофильная эластаза и ММП-9, ассоциированные с NET, последовательно расщепляют ламинины, которые затем индуцируют пролиферацию спящих раковых клеток [10, 39]. Кроме того, NET, содержащие мощные протеазы, могут способствовать метастазированию, расщепляя внеклеточный матрикс. Сети могут также образовывать барьер между раковыми клетками и иммунной системой, что позволяет раковым клеткам избегать иммунного распознавания [13]. Понятие «иммунодефицит рака (immunoediting)» [32] предполагает, что иммунная система может как идентифицировать и уничтожать опухолевые клетки, так и способствовать прогрессированию опухоли. В многочисленных исследованиях было установлено, что про- либо противоопухолевая активность Нф зависит от типа локализации и стадии процесса и профиля цитокинов микроокружения опухо-

ли [5, 52]. Показано, что Нф могут способствовать росту опухоли путем секреции ММП-9, которая предотвращает апоптоз опухолевых клеток [9], а также опухолевому ангиогенезу и неоваскуляризации [36]. При этом Нф, продуцируя перекись водорода, подавляют реакции адаптивного иммунитета [49]. Имеются также данные об изменении функций Нф при развитии опухоли [8, 53]. Однако более 90% результатов, представленных в публикациях, посвященных роли Нф в динамике канцерогенеза, получены в эксперименте и для опухоль-ассоциированных клеток.

Целью исследования было изучение фенотипа циркулирующих Нф на разных стадиях неоплазии шейки матки.

Материалы и методы

Обследуемая группа состояла из 31 пациентки с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (CIN) и 21 первичных больных РШМ Ia стадии (по FIGO), находящихся на лечении в Ульяновском областном клиническом онкологическом диспансере. Контрольную группу составили практически здоровые женщины ($n = 25$) в возрасте 22–45 лет. Нейтрофилы выделяли из лейкоцитарной взвеси на двойном градиенте плотности стерильных растворов фиколла-урографина ($\rho = 1,117$ и $1,077$ г/мл). Чистота фракции нейтрофилов составляла 92–94%. Жизнеспособность нейтрофилов в тесте с 0,5% трипановым синим составляла 95%. Выделенные и отмытые нейтрофилы помещали по 50 ± 5 тысяч клеток в 1,5 мл физиологического раствора и путем замораживания-оттаивания из них получали лизаты. Спонтанную продукцию эластазы (eBioscience, Австрия) и активных форм матриксных металлопротеиназ (ММП-9 (Quantikine, R&D Systems, США), ММП-1 (BCM Diagnostics, США), ММП-13 (BenderMedSystems, США)), IL-2, IL-8, IL-18, IFN γ , G-CSF (ЗАО «Вектор-Бест-Волга», Россия) определяли твердофазным иммуноферментным методом в сыворотке крови и лизате Нф. Лизаты Нф хранились в течение месяца при -25 °С. Для определения NET, нейтрофилы, выделенные из периферической крови, окрашивали с помощью 0,04% раствором акридинового оранжевого по методу Долгушина И.И. и соавт. (2010). Образование внеклеточных ловушек оценивали после инкубации Нф с выбранной нами в качестве индуктора суточной культурой *Saccharomyces cerevisiae*. Полученные результаты оценивали на флуоресцентном микроскопе, используя при этом фильтры, которые обеспечивают возбуждающий свет с длиной волны не более 490 нм и эмиссию с длиной волны 520 нм. В суспензии подсчитывали число нейтрофилов с сегментированным ядром, клеток с недифференци-

рованным ядром и NET, которые пересчитывали на 100 клеток. Полученные результаты выражали в процентах. Высчитывали число нейтрофильных ловушек (%) — количество нейтрофильных ловушек, содержащих дрожжевые клетки, из 100 подсчитанных сетеподобных структур; и индекс нейтрофильной ловушки (у. е.) — число дрожжевых клеток в 100 подсчитанных ловушках в пересчете на 1 структуру.

Оценивали общее количество лейкоцитов, абсолютное и относительное количество Нф, способность Нф генерировать АФК в реакции восстановления нитросинего тетразолия (спонтанный и индуцированный НСТ-тест) [2]. Микробицидную активность оценивали и по уровню активности миелопероксидазы методом Грэхема—Кнолля и катионных белков по М.Г. Шубичу [6]. Результаты выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Иммунофенотипирование нейтрофилов проводили на флуоресцентном микроскопе Nikon Ni-U с использованием моноклональных антител (МКА) к поверхностным антигенам CD11b, CD16, CD63, CD95 (ЗАО «Сорбент», Москва).

Статистический анализ данных производился с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 10 (One-way ANOVA).

В качестве центральной характеристики применяли медиану, а при сравнении использовали непараметрический критерий Манна—Уитни. Статистически значимыми считали данные при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Нами установлено снижение общего количества лейкоцитов и абсолютного количества Нф у больных с дисплазией и увеличение этих показателей и относительного количества Нф у пациенток с РШМ (табл. 1).

При этом отношение Нф к лимфоцитам (NLR) у пациентов с дисплазией составило $\geq 2,1$; с РШМ $\geq 3,4$ против $\geq 1,4$ в контроле. Сходную динамику количества Нф и отношение NLR при дисплазии и РШМ отмечали ряд исследователей [54]. Авторы указывают, что в группе с нейтрофилией при РШМ было повышено число рецидивов и метастазов по сравнению с пациентами с нейтрофилией при дисплазии шейки матки. Cho H. и соавт. показали, что у пациентов с первичным РЯ NLR значительно выше, чем у пациентов с доброкачественными гинекологическими заболеваниями или в контроле [19]. При этом было показано, что повышенное количество Нф связано с короткой, общей и безрецидивной выживаемостью [50]. Таким образом, данные литературы свидетельствуют о связи высокого уровня Нф циркулирующей крови с плохим клиническим исходом у больных

раком. Эффекторные функции иммунных клеток тесно связаны с их метаболическим состоянием. Анализ полученных данных свидетельствует, что активность МПО в спонтанном тесте при дисплазии шейки матки оказывается значимо повышенной по сравнению с контролем и имеет тенденцию к дальнейшему повышению у больных РШМ Ia (табл. 2).

Интенсивность продукции Нф активных форм кислорода (АФК) осуществляется в основном при участии NADPH-оксидазы и дыхательной цепи митохондрий МПО [31]. Нами установлено значимое увеличение количества Нф, активных как в спонтанном, так и в активированном НСТ-тесте у больных с дисплазией шейки матки (табл. 2), и резкое снижение числа этих Нф по сравнению с контролем у пациентов с РШМ Ia (табл. 2).

АФК, продуцируемые активированными Нф, с одной стороны, участвуют в лизисе опухолевых клеток [61], с другой — действие АФК может быть генотоксичным и, следовательно, проопухолевым. Существует мнение, что исходная мутация (смерть будет зависеть от дозы АФК) [43].

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать повышенную по сравнению со здоровыми спонтанную и индуцированную кислородзависимую (МПО, НСТ-тест) цитолитическую активность циркулирующих Нф у пациенток с дисплазией шейки матки. Нф при этом, возможно, могут повреждать клетки организма. У пациенток с РШМ Ia как кислородзависимая, так и кислород-независимая активность (КБ) была резко и значимо снижена в циркулирующих Нф как по сравнению со здоровыми, так и по сравнению с пациентами с дисплазией шейки матки. Нф при этом, вероятно, не способны полноценно защищать организм от патогенов.

Fridlender Z.G. и соавт. (2009) постулировали наличие N1 (противоопухолевых) и N2 (протуморальных) опухолеподобных Нф [25]. Эта пластичность Нф регулируется молекулами в микроокружении опухоли. Трансформирующий фактор роста (TGF- β) — иммуносупрессивный цитокин, индуцирует фенотип N2 и предотвращает образование проопухолевых N1. При TGF- β блокаде N1 усиленно экспрессируют иммуноактивирующие цитокины и хемокины, более низкие уровни аргиназы, более высокую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток, ингибируют ангиогенную активность опухоли, существует концепция поляризации Нф средой цитокинов. Возможно, что изменения в фенотипах N1 и N2 основаны на различной степени активации Нф. Однако неясно, являются ли N1 просто более активными, чем N2 [43].

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ФАГОЦИТОЗА И ОБРАЗОВАНИЯ NET НЕЙТРОФИЛАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ДИСПЛАЗИЕЙ И РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ

TABLE 1. INDICATORS OF PHAGOCYTOSIS AND THE FORMATION OF NET BY NEUTROPHILS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH DYSPLASIA AND CERVICAL CANCER

Группа Group	Показатель Indicator	Контроль Control n = 25	Дисплазия Dysplasia n = 21	Рак шейки матки Cervical cancer n = 15
	Активность фагоцитоза, % Phagocytosis activity, %	3,50±1,82	4,71±0,63	2,25±0,77 [#]
	Интенсивность фагоцитоза, у. е. Phagocytosis intensity, c. u.	1,52±0,07	1,05±0,02	0,38±0,18* [#]
	Индекс NET, у. е. NET index, c. u.	1,50±0,29	2,71±0,46	0,88±0,11* [#]
	Число NET, % NET count, %	1,33±0,33	4,76±1,06*	8,75±3,03* [#]

Примечание. * – показатель значительно отличается от такового в контроле; [#] – показатель значительно отличается от такового при дисплазии.

Note. *, the level is significantly different from that in the control; [#], the level is significantly different from that in dysplasia.

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО ЛЕЙКОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ С ДИСПЛАЗИЕЙ И РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ

TABLE 2. NUMBER OF LEUKOCYTES AND NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CERVICAL DYSPLASIA AND CERVICAL CANCER

Группа Group	Показатель Indicator	Контроль Control (n = 25)	Дисплазия Dysplasia (n = 31)	Рак шейки матки Ia CCla (n = 21)
	Количество Ле × 10 ⁹ /л Number of Le × 10 ⁹ /l	6,401±0,280	5,87±0,11 (p ₁ = 0,8490)	6,72±0,53 (p ₁ = 0,3527; p ₂ = 0,4491)
	Количество Нф, % Percentage of Nph, %	55,910±2,060	57,79±2,59 (p ₁ = 0,3793)	65,0±2,9 (p ₁ = 0,1468; p ₂ = 0,2836)
	Количество Нф × 10 ⁹ /л Number of Nph × 10 ⁹ /l	3,600±0,030	2,48±0,27 (p ₁ = 0,0001)	4,29±0,21 (p ₁ = 0,0063; p ₂ = 0,1665)

Примечание. p₁ – по сравнению с контролем; p₂ – по сравнению с дисплазией шейки матки.

Note. p₁, compared with the control; p₂, compared with group of cervical dysplasia.

В циркулирующей крови организма-опухоленосителя выявляется несколько клеточных популяций клеток с нейтрофилоподобной морфологией и проявляющих иммуносупрессивные или провоспалительные свойства [17, 24, 44]. При центрифугировании в градиенте плотности можно получить две основные популяции: Нф низкой плотности и Нф нормальной плотности. Сообщается, что Нф нормальной плотности имеют классические воспалительные характеристики (фракция N1). Нф с низкой плотностью (N2)

имеют противовоспалительный фенотип и усиливают прогрессирование опухоли [47, 58].

Нф формируют «цитокиновую сеть», секретируя огромный спектр про- и противовоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов, колониестимулирующих факторов, регуляторных белков [35,51]. В результате проведенных исследований нами установлены значимые изменения по сравнению с контролем уровня IL-2, IFN γ , G-CSF, эластазы и MMP-9 в сыворотке крови и лизате Нф больных с дисплазией шейки матки

и РШМ Ia (табл. 3, 4). Нами было установлено значимое увеличение уровня IL-2, относящегося к регуляторным цитокинам, в сыворотке крови и лизате Нф у пациентов с дисплазией шейки матки и резко выраженное его увеличение при РШМ Ia (табл. 3, 4). Существует мнение, что повышение системного уровня IL-2 стимулирует опухолевый рост, а иммунные клетки у больных с дисплазией шейки матки экспрессируют рецепторы к IL-2, что может свидетельствовать об их активации [1, 33].

Наиболее изученным и общепризнанным механизмом Нф-индуцированной прогрессией опухоли является усиление ангиогенеза. Это реализуется при участии такого ангиогенного фактора, как MMP-9 [11]. MMP-9 и эластаза участвуют в инвазии и миграции опухолевых клеток, что способствует метастазированию опухолей [55]. Также показано, что MMP-9 предотвращает апоптоз опухолевых клеток, в частности при раке легких [9].

IL-8 считается сильным хемоаттрактантом, активирующим миграцию Нф в опухоль. При этом сами опухолевые клетки могут секретировать IL-8 [27]. Длительность жизни Нф увеличивается в зоне воспаления, что индуцируется IL-8 и GM-CSF [16]. Повышенный уровень этого цитокина в крови больных с плоскоклеточным раком головы и шеи был ассоциирован с прогрессированием опухолевого процесса [57]. Нами установлено значимое снижение уровня IL-8 в лизате периферических Нф больных РШМ Ia и повышение уровня этого цитокина в сыворотке крови при дисплазии шейки матки (табл. 3, 4).

Считается доказанным, что Нф могут быть основным источником цитокинов [18]. В то же время показано, что ряд цитокинов, включая IFN γ и G-CSF, индуцирующих местный гранулоцитоз *in vivo*, могут секретироваться опухолевыми клетками [22]. При этом регуляторные цитокины, в том числе IFN γ , подавляют входение Нф в апоптоз и удлиняют время их жизни [29]. Нами установлено резкое и значимое возрастание уровней IFN γ и G-CSF в лизате Нф у больных с дисплазией шейки матки по сравнению с контролем (табл. 3). У пациентов с РШМ уровень данных цитокинов возвращается к норме (табл. 3). В сыворотке крови уровень IFN γ , резко повышенный у больных с дисплазией, несколько снижается у больных с РШМ, не достигая, однако, нормы (табл. 4). Уровень G-CSF оказывается сниженным по сравнению с нормой у больных с дисплазией и РШМ (табл. 4).

Таким образом, анализ спектра цитокинов в лизате Нф и сыворотке крови позволяет предполагать значимые изменения уровней изученных цитокинов у пациентов в лизате перифери-

ческих нейтрофилов уже на стадии дисплазии шейки матки. При этом на фоне резкого увеличения как в лизате, так и в плазме крови уровня регуляторного IFN γ значимо возрастают уровни «проопухолевых» MMP-9, IL-2 и G-CSF. Уровень IL-8, праймирующего активацию Нф на стадии дисплазии, повышается только в сыворотке крови. В лизате Нф и плазме крови больных с РШМ повышенным остается уровень IL-2 и значимо возрастает уровень MMP-9.

Показано, что Нф при встрече с опухолевыми клетками активируются и формируют вокруг них NET [3]. В ранних исследованиях была установлена зависимость формирования NET от активных форм кислорода (ROS), генерируемых NADPH-оксидазным путем [26]. Однако в ряде исследований *in vitro* и *in vivo* была установлена независимость образования NET от ROS [12, 37]. Это несоответствие на данном этапе не имеет объяснения. В результате проведенных нами исследований установлено значимое возрастание числа NET, образованных Нф больных раком шейки матки, как по сравнению с контролем, так и по сравнению с Нф пациенток с дисплазией (табл. 5).

Активность миелопероксидазы нейтрофилов периферической крови женщин с раком шейки матки Ia умеренно ($r = 0,3217$) коррелирует с уровнем НВЛ, в отличие от нейтрофилов периферической крови женщин с дисплазией, где обнаружена слабая положительная корреляционная связь по Спирмену ($r = 0,2189$).

Существует точка зрения, что снижение фагоцитоза и усиление ROS-продукции характерны для проопухолевого фенотипа Нф. Подобные Нф, их также называют клетками низкой плотности, были описаны при раке и имеют повышенную спонтанную продукцию NET [46].

Анализируя полученные данные, мы предположили, что исследованные показатели плазмы и Нф циркулирующей крови могут быть использованы в качестве маркеров прогрессии цервикальных неоплазий. Нами был использован дисперсионный анализ ANOVA. Было отобрано 10 показателей, дающих четкие межгрупповые различия нормы (1) и дисплазией (2) с РШМ (3) (ИНЛ, у. е.; ВНЛ, %; CD95 + Нф, уровень IL-2, MMP-9, эластазы, IL-8 лизате Нф, а также уровень MMP-13, IL-2, эластазы в сыворотке крови).

Было установлено, что идеальный показатель — уровень IL-2 в сыворотке крови. Его достаточно для того, чтобы различить принадлежность к любой из групп.

Можно предположить, что указанные в графиках изменения непрерывны и не имеют дополнительных колебаний.

ТАБЛИЦА 3. АКТИВНОСТЬ МПО, ПОКАЗАТЕЛИ СПОНТАННОГО И ИНДУЦИРОВАННОГО НСТ-ТЕСТА И УРОВЕНЬ КБ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НФ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ НЕОПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ

TABLE 3. MPO ACTIVITY, INDICES OF SPONTANEOUS AND INDUCED NBT TEST AND THE CP LEVEL IN CIRCULATING NP AT DIFFERENT STAGES OF CERVICAL NEOPLASIA

Показатель Indicator Группа Group	МПО, СЦК MPO, mean cytochemical coefficient	КБ, СЦК CP, mean cytochemical coefficient	НСТ-тест NBT test			
			Спонтанный Spontaneous		Индукцированный Induced	
			% активных клеток % active cells	у. е. с. у.	% активных клеток % active cells	у. е. с. у.
Контроль Control n = 25	1,18±0,13	2,34±0,09	99,33±0,38	1,56±0,18	99,83±0,17	2,23±0,19
Дисплазия Dysplasia n = 31	1,86±0,21 (p ₁ = 0,0199)	2,46±0,04 (p ₁ = 0,7044)	97,53±0,58 (p ₁ = 0,0267)	2,78±0,14 (p ₁ = 0,7960)	98,89±0,19 (p ₁ = 0,4815)	3,63±0,14 (p ₁ = 0,7960)
РШМ Ia CC Ia n = 21	1,95±0,16 (p ₁ = 0,0018; p ₂ = 0,8792)	1,85±0,08 (p ₁ = 0,0019; p ₂ = 0,0052)	95,67±1,13 (p ₁ = 0,0211; p ₂ = 0,4722)	0,50±0,30 (p ₁ = 0,1795; p ₂ = 0,0550)	97,67±0,23 (p ₁ = 0,2225; p ₂ = 0,4035)	1,18±0,06 (p ₁ = 0,7142; p ₂ = 0,3403)

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 4. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ, ЭЛАСТАЗЫ И МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В ЛИЗАТЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕЙТРОФИЛОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ НЕОПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ

TABLE 4. LEVEL OF CYTOKINES, ELASTASE AND MATRIX METALLOPROTEINASES IN THE LYSATE OF PERIPHERAL NEUTROPHILS AT DIFFERENT STAGES OF CERVICAL NEOPLASIA

	Контроль Control n = 25	Дисплазия шейки матки Cervical dysplasia n = 31	РШМ Ia CC Ia n = 21
IL-2, пг/мл pg/ml	3,953±0,515 (3,246-4,956)	8,052±0,401* (5,035-14,692)	59,835±3,177*# (10,620-97,459)
IL-8, пг/мл pg/ml	165,162±15,888 (57,064-237,041)	175,187±8,305 (30,147-258,482)	60,538±6,519*# (11,249-112,185)
IL-18, пг/мл pg/ml	45,898±16,550 (5,378-160,664)	51,645±9,559 (5,657-308,490)	14,198±2,208*# (5,343-35,832)
IFNγ, пг/мл pg/ml	2,510±0,468 (0,000-4,879)	11,400±0,691* (4,463-16,987)	3,255±0,211# (1,06-6,47)
G-CSF, пг/мл pg/ml	0,129±0,037 (0,000-0,282)	11,568±1,136* (3,043-23,563)	0
Эластаза, нг/мл Elastase, ng/ml	0,353±0,049 (0,117-0,687)	0,691±0,064* (0,101-1,520)	2,168±0,113*# (1,038-3,205)
ММП-1, нг/мл MMP-1, ng/ml	0,507±0,051 (0,126-0,743)	0,603±0,031 (0,194-0,868)	0,753±0,059 (0,344-1,180)
ММП-9, нг/мл MMP-9, ng/ml	29,814±0,504 (26,663-30,742)	41,064±0,143* (38,000-41,873)	1,143±0,063*# (0,83-1,58)
ММП-13, нг/мл MMP-13, ng/ml	11,818±1,693 (0,000-22)	10,615±0,095 (9,163-11,000)	8,905±0,006 (0,000-18,5)

Примечание. * – отличие статистически значимо по сравнению с контролем (p ≤ 0,05); # – отличие статистически значимо по сравнению с показателем при дисплазии (p ≤ 0,05).

Note. *, the difference is statistically significant compared with the control (p ≤ 0.05); #, the difference is statistically significant compared with the level in dysplasia (p ≤ 0.05).

ТАЛИЦА 5. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ, ЭЛАСТАЗЫ И МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ НА РАЗНОЙ СТАДИИ НЕОПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ

TABLE 5. LEVEL OF CYTOKINES, ELASTASE AND MATRIX METALLOPROTEINASES IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS AT DIFFERENT STAGES OF CERVICAL NEOPLASIA

	Контроль Control n = 25	Дисплазия шейки матки Cervical dysplasia n = 31	РШМ Ia CC Ia n = 21
IL-2, пг/мл pg/ml	2,428±0,229 (1,289-3,634)	3,758±0,044 (3,398-4,095)	22,667±0,932*# (11,182-30,736)
IL-8, пг/мл pg/ml	12,487±1,269 (7,848-23,188)	24,144±1,462* (5,765-38,493)	14,513±0,590 # (10,426-18,921)
IL-18, пг/мл pg/ml	310,294±83,903 (0,000-874,858)	434,789±17,607 (273,583-669,655)	450,783±11,956 (359,497-543,092)
IFNγ, пг/мл pg/ml	4,183±0,702 (1,086-9,111)	13,475±1,226* (4,012-29,016)	12,714±2,359* (1,27-43,17)
G-CSF, пг/мл pg/ml	49,029±6,388 (1,413-93,299)	37,125±1,537* (9,687-56,685)	29,963±1,851*# (12,189-55,953)
Эластаза, нг/мл Elastase, ng/ml	2,227±0,125 (1,663-3,117)	1,059±0,004* (1,012-1,117)	1,770±0,025 (1,562-1,981)
ММП-1, нг/мл MMP-1, ng/ml	0,086±0,008 (0,038-0,114)	0,247±0,007* (0,185-0,354)	0,348±0,029* (0,117-0,663)
ММП-9, нг/мл MMP-9, ng/ml	4,159±0,531 (0,915-8,093)	5,654±0,296 (1,687-9,180)	9,419±0,718* (2,706-14,404)
ММП-13, нг/мл MMP-13, ng/ml	20,454±2,305 (11,0-33,0)	18,662±0,075 (18,037-19,000)	6,766±1,267*# (0,0-22,5)

Примечание. * – отличие статистически значимо по сравнению с контролем; # – отличие статистически значимо по сравнению с показателем при дисплазии.

Note. *, the difference is statistically significant compared with the control; #, the difference is statistically significant compared with level in dysplasia.

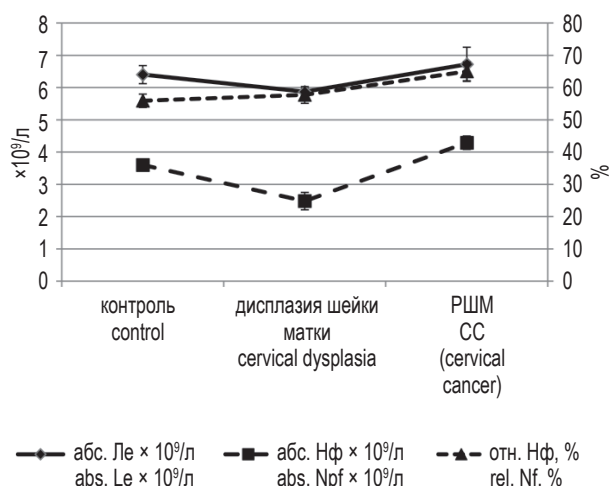


Рисунок 1. Алгоритм оценки степени цервикальной неоплазии

Figure 1. Algorithm for assessing the grade of cervical neoplasia

В этом случае для оценки степени цервикальной неоплазии может быть использован следующий алгоритм (рис. 1): если уровень IL-2 ниже 3,0, констатируем отсутствие неоплазии; если уровень IL-2 выше 3,0, рекомендуется дополнительная оценка в лизате Нф периферической крови уровни ММП-9. Дисплазия вероятна при уровне ММП-9 выше 40; РШМ – при уровне ММП-9 ниже 5.

Закключение

На фоне значимого снижения абсолютного количества Нф циркулирующей крови пациентов с дисплазией шейки матки, по сравнению с нормой, характеризуются повышенной кислородозависимой цитолитической и фагоцитарной активностью и повышенной спонтанной продукцией NET, что может свидетельствовать об их противоопухолевой активности. В то же время уже на стадии дисплазии как в Нф, так и в плазме крови возрастают по сравнению с нормой уровни «проопухолевых» цитокинов ММП-9, IL-2 и G-CSF. Высокие уровни в плазме крови регуляторного IFN γ и праймирующего активацию

нейтрофилов IL-8 не предполагают использование на стадии дисплазии шейки матки экзогенных стимуляторов активности Нф. У пациенток на начальной стадии РШМ значимо по сравнению с нормой увеличено абсолютное количество Нф циркулирующей крови. Однако на фоне повышенной спонтанной кислородзависимой цитолитической активности у них значимо снижена активность фагоцитоза и резко повышена

спонтанная продукция NET, что в целом характерно для «проопухолевого» фенотипа Нф. В Нф и плазме крови больных РШМ Ia сохраняется повышенный уровень IL-2 и продолжает возрастать уровень ММП-9. Таким образом, полученные результаты позволяют предполагать изменение фенотипа циркулирующих Нф при переходе от дисплазии к РШМ в сторону увеличения проопухолевых клеток низкой плотности.

Список литературы / References

1. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли I. Клетки и цитокины – участники воспаления // Онкология, 2009. № 1. С. 6-17. [Berezhnaya N.M. Role of immune system cells in tumor microenvironment. I. Cells and cytokines – the components of inflammation. *Oncologiya = Oncology*, 2009, no. 1, pp. 6-17. (In Russ.)]
2. Герасимов И.Г., Калущая О.А. Кинетика реакции восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами крови человека // Цитология, 2000. Т. 42, № 2. С. 160-165. [Gerasimov I.G., Kalutskaya O.A. Kinetics of the reaction of nitroblue tetrazolium reduction by human blood neutrophils. *Tsitologiya = Cytology*, 2000, Vol. 42, no. 2, pp. 160-165. (In Russ.)]
3. Долгушин И.И., Семенова А.Б., Шишкова Ю.С., Казачков Е.Л., Шаманова А.Ю., Важенин А.В. Функциональная активность нейтрофилов и процессы формирования ими сетей внеклеточной ДНК при встрече с опухолевыми клетками карциномы молочной железы // Медицинский вестник Башкортостана, 2014. Т. 9, № 5. С. 132-135. [Dolgushin I.I., Semenova A.B., Shishkova Yu.S., Kazachkov E.L., Shamanova A.Yu., Vazhenin A.V. Functional activity of neutrophils and processes of formation of extracellular DNA networks after their contact with tumor cells of breast carcinoma. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal*, 2014, Vol. 9, no. 5, pp. 132-135. (In Russ.)]
4. Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Семенова А.Б., Казачков Е.Л., Важенин А.В., Шаманова А.Ю., Димов Г.П. Взгляд на роль нейтрофильного внеклеточного ДНК, как компонента микроокружения опухоли, в процессах канцерогенеза // Уральский медицинский журнал, 2014. № 2 (116). С. 19-22. [Dolgushin I.I., Shishkova Yu.S., Semenova A.B., Kazachkov E.L., Vagenin A.V., Shamanova A.Yu., Dimov G.P. View on the role of neutrophils extracellular DNA as a component of the microenvironment of tumor in the process of carcinogenesis. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2014, no. 2 (116), pp. 19-22. (In Russ.)]
5. Мальцева В.Н., Авхачева Н.В., Санталов Б.Ф., Сафронова В.Г. Наблюдение в динамике модификации функциональной активности периферических нейтрофилов и ее регуляции при росте опухоли *in vivo* // Цитология, 2006. Т. 48, № 12. С. 1000-1009. [Maltseva V.N., Avkhacheva N.V., Santalov B.F., Safronova V.G. Dynamic analysis of modification of peripheral neutrophils functional activity and its regulation during tumor growth *in vivo*. *Tsitologiya = Cytology*, 2006, Vol. 48, no. 12, pp. 1000-1009. (In Russ.)]
6. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы: руководство для врачей / под ред. А.И. Карпищенко. 3-е изд., перераб. и доп. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. 696 с. [Medical laboratory diagnostics: programs and algorithms: a guide for doctors. Ed. A.I. Karpischenko. 3rd ed., rev. and enlarged]. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 696 p.
7. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Коков Е.А., Ломтатидзе Л.В., Сторожук С.В., Уваров И.Б., Казанцева М.В. Особенности фенотипа нейтрофильных гранулоцитов при неопластических процессах // Российский иммунологический журнал, 2010. Т. 4 (13), № 4. С. 374-380. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Kokov E.A., Lomtadidze L.V., Storozhuk S.V., Uvarov I.B., Kazantseva M.V. The neutrophil phenotype in neoplastic process. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2010, Vol. 4 (13), no. 4, pp. 374-380. (In Russ.)]
8. Чердынцева Н.В., Наумов С.А., Удут В.В., Пешкова О.А., Шепеткин И.А. Окислительный метаболизм нейтрофильных гранулоцитов крови при предраке и раке желудка // Биохимия, 1992. № 7. С. 182-187. [Cherdyntseva N.V., Naumov S.A., Udut V.V., Peshkova O.A., Shepetkin I.A. Oxidative metabolism of neutrophilic blood granulocytes in precancer and gastric cancer. *Biokhimiya = Biochemistry*, 1992, no. 7, pp. 182-187. (In Russ.)]
9. Acuff H.B., Carter K.J., Fingleton B., Gorden D.L., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res.*, 2006, Vol. 66, no. 1, pp. 259-266.
10. Albregues J., Shields M.A., Ng D., Park C.G., Ambrico A., Poindexter M.E., Upadhyay P., Uyeminami D.L., Pommier A., Küttner V., Bružas E., Maiorino L., Bautista C., Carmona E.M., Gimotty P.A., Fearon D.T., Chang K., Lyons S.K., Pinkerton K.E., Trotman L.C., Goldberg M.S., Yeh J.T., Egeblad M. Neutrophil extracellular traps

produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science*, 2018, Vol. 361, no. 6409. pii: eaao4227. doi: 10.1126/science.aao4227.

11. Ardi V.C., Kupriyanova T.A., Deryugina E.I., Quigley J.P. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, no. 51, pp. 20262-20267.

12. Barth C.R., Funchal G.A., Luft C., de Oliveira J.R., Porto B.N., Donadio M.V. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, no. 4, pp. 964-970.

13. Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abed U.A., Kühn L.I., Ben-Ezra J., Elhasid R., Zychlinsky A. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 48.

14. Borregaard N., Sørensen O.E., Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.*, 2007, Vol. 28, no. 8, pp. 340-345.

15. Brú A., Albertos S., López García-Asenjo J.A., Brú I. Pinning of tumoral growth by enhancement of the immune response. *Phys. Rev. Lett.*, 2004, Vol. 92, no. 23, 238101. doi: 10.1103/PhysRevLett.92.238101.

16. Buckley C.D., Ross E.A., McGettrick H.M., Osborne C.E., Haworth O., Schmutz C., Stone P.C., Salmon M., Matharu N.M., Vohra R.K., Nash G.B., Rainger G.E. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 79, no. 2, pp. 303-311.

17. Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol.*, 2013, Vol. 35, no. 4, pp. 455-463.

18. Cassatella M.A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.*, 1999, Vol. 73, pp. 369-509.

19. Cho H., Hur H.W., Kim S.W., Kim S.H., Kim J.H., Kim Y.T., Lee K. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2009, Vol. 58, no. 1, pp. 15-23.

20. Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B., Gowing S., Chow S., Giannias B., Bourdeau F., Kubes P., Ferri L. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.*, 2013, pii: 67484. doi: 10.1172/JCI67484.

21. di Carlo E., Forni G., Lollini P., Colombo M.P., Modesti A., Musiani P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 2, pp. 339-345.

22. di Carlo E., Forni G., Musiani P. Neutrophils in the antitumoral immune response. *Chem. Immunol. Allergy*, 2003, Vol. 83, pp. 182-203.

23. Donskov F., von der Maase H. Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2006, Vol. 24, no. 13, pp. 1997-2005.

24. Dumitru C.A., Moses K., Trellakis S., Lang S., Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 8, pp. 1155-1167.

25. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G.S., Albelda S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 2009, Vol. 16, no. 3, pp. 183-194.

26. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.*, 2007, Vol. 176, no. 2, pp. 231-241.

27. Gregory A.D., Houghton A.M. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.*, 2011, Vol. 71, no. 7, pp. 2411-2416.

28. Gupta A.K., Joshi M.B., Philippova M., Erne P., Hasler P., Hahn S., Resink T.J. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.*, 2010, Vol. 584, no. 14, pp. 3193-3197.

29. Ichikawa H., Kokura S., Aw T.Y. Role of endothelial mitochondria in oxidant production and modulation of neutrophil adherence. *J. Vasc. Res.*, 2004, Vol. 41, no. 5, pp. 432-444.

30. Igney F.H., Behrens C.K., Krammer P.H. CD95L mediates tumor counterattack *in vitro* but induces neutrophil-independent tumor rejection *in vivo*. *Int. J. Cancer*, 2005, Vol. 113, no. 1, pp. 78-87.

31. Ishikawa F., Miyazaki S. New biodefense strategies by neutrophils. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2005, Vol. 53, no. 3, pp. 226-233.

32. Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 2007, Vol. 121, no. 1, pp. 1-14.

33. Kobayashi A., Greenblatt R.M., Anastos K., Minkoff H., Massad L.S., Young M., Levine A.M., Darragh T.M., Weinberg V., Smith-McCune K.K. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. *Cancer Res.*, 2004, Vol. 64, no. 18, pp. 6766-6774.

34. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 3, pp. 159-175.

35. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 8, pp. 519-531.

36. Masson V., de la Ballina L.R., Munaut C., Wielockx B., Jost M., Maillard C., Blacher S., Bajou K., Itoh T., Itohara S., Werb Z., Libert C., Foidart J.M., Noël A. Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB J.*, 2005, Vol. 19, no. 2, pp. 234-236.
37. Mejía S.P., Cano L.E., López J.A., Hernandez O., González Á. Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*, 2015, Vol. 161, no. 5, pp. 1008-1017.
38. Menegazzi R., Declève E., Dri P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 5, pp. 1214-1216.
39. Najmeh S., Cools-Lartigue J., Rayes R.F., Gowing S., Vourtzoumis P., Bourdeau F., Giannias B., Berube J., Rousseau S., Ferri L.E., Spicer J.D. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via β 1-integrin mediated interactions. *Int. J. Cancer*, 2017, Vol. 140, no. 10, pp. 2321-2330.
40. Nozawa H., Chiu C., Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 33, pp. 12493-12498.
41. Ortmann W., Kolaczowska E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. *Cell Tissue Res.*, 2018, Vol. 371, no. 3, pp. 473-488.
42. Otten M.A., Bakema J.E., Tuk C.W., Glennie M.J., Tutt A.L., Beelen R.H., van de Winkel J.G., van Egmond M. Enhanced Fc α RI-mediated neutrophil migration towards tumour colonies in the presence of endothelial cells. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 7, pp. 1815-1821.
43. Piccard H., Muschel R.J., Opdenakker G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2012, Vol. 82, no. 3, pp. 296-309.
44. Pillay J., Tak T., Kamp V.M., Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2013, Vol. 70, no. 20, pp. 3813-3827.
45. Saffarzadeh M., Juenemann C., Queisser M.A., Lochnit G., Barreto G., Galuska S.P., Lohmeyer J., Preissner K.T. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 2, e32366. doi: 10.1371/journal.pone.0032366.
46. Sagiv J.Y., Michaeli J., Assi S., Mishalian I., Kisos H., Levy L., Damti P., Lumbroso D., Polyansky L., Sionov R.V., Ariel A., Hovav A.H., Henke E., Fridlender Z.G., Granot Z. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep.*, 2015, Vol. 10, no. 4, pp. 562-573.
47. Schernberg A., Blanchard P., Chargari C., Deutsch E. Neutrophils, a candidate biomarker and target for radiation therapy? *Acta Oncol.*, 2017, Vol. 56, no. 11, pp. 1522-1530.
48. Schmidt H., Suciu S., Punt C.J., Gore M., Kruit W., Patel P., Lienard D., von der Maase H., Eggermont A.M., Keilholz U.; American Joint Committee on Cancer Stage IV Melanoma; EORTC 18951. Pretreatment levels of peripheral neutrophils and leukocytes as independent predictors of overall survival in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV Melanoma: results of the EORTC 18951 Biochemotherapy Trial. *J. Clin. Oncol.*, 2007, Vol. 25, no. 12, pp. 1562-1569.
49. Schmielau J., Finn O.J. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, no. 12, pp. 4756-4760.
50. Sharaiha R.Z., Halazun K.J., Mirza F., Port J.L., Lee P.C., Neugut A.I., Altorki N.K., Abrams J.A. Elevated preoperative neutrophil:lymphocyte ratio as a predictor of postoperative disease recurrence in esophageal cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 2011, Vol. 18, no. 12, pp. 3362-3369.
51. Smuda C., Wechsler J.B., Bryce P.J. TLR-induced activation of neutrophils promotes histamine production via a PI3 kinase dependent mechanism. *Immunol. Lett.*, 2011, Vol. 141, no. 1, pp. 102-108.
52. Souto J.C., Vila L., Brú A. Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. *Med. Res. Rev.*, 2011, Vol. 31, no. 3, pp. 311-363.
53. Szuster-Ciesielska A., Hryciuk-Umer E., Stepulak A., Kupisz K., Kandefer-Szerszeń M. Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol.*, 2004, Vol. 43, no. 3, pp. 252-258.
54. Tavares-Murta B.M., Mendonça M.A., Duarte N.L., da Silva J.A., Mutão T.S., Garcia C.B., Murta E.F. Systemic leukocyte alterations are associated with invasive uterine cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2010, Vol. 20, no. 7, pp. 1154-1159.
55. Tazawa H., Okada F., Kobayashi T., Tada M., Mori Y., Une Y., Sendo F., Kobayashi M., Hosokawa M. Infiltration of neutrophils is required for acquisition of metastatic phenotype of benign murine fibrosarcoma cells: implication of inflammation-associated carcinogenesis and tumor progression. *Am. J. Pathol.*, 2003, Vol. 163, no. 6, pp. 2221-2232.
56. Teramukai S., Kitano T., Kishida Y., Kawahara M., Kubota K., Komuta K., Minato K., Mio T., Fujita Y., Yonei T., Nakano K., Tsuboi M., Shibata K., Furuse K., Fukushima M. Pretreatment neutrophil count as an independent prognostic factor in advanced non-small-cell lung cancer: an analysis of Japan Multinational Trial Organisation LC00-03. *Eur. J. Cancer*, 2009, Vol. 45, no. 11, pp. 1950-1958.
57. Trellakis S., Farjah H., Bruderek K., Dumitru C.A., Hoffmann T.K., Lang S., Brandau S. Peripheral blood neutrophil granulocytes from patients with head and neck squamous cell carcinoma functionally differ from their counterparts in healthy donors. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2011, Vol. 24, no. 3, pp. 683-693.
58. Uribe-Querol E., Rosales C. Neutrophils in cancer: two sides of the same coin. *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, 983698. doi: 10.1155/2015/983698.

59. van Spriel A.B., Leusen J.H., van Egmond M., Dijkman H.B., Assmann K.J., Mayadas T.N., van de Winkel J.G. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 8, pp. 2478-2486.
60. Yipp B.G., Petri B., Salina D., Jenne C.N., Scott B.N., Zbytnuik L.D., Pittman K., Asaduzzaman M., Wu K., Meijndert H.C., Malawista S.E., de Boisleury Chevance A., Zhang K., Conly J., Kubes P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking *in vivo*. *Nat. Med.*, 2012, Vol. 18, no. 9, pp. 1386-1393.
61. Zivkovic M., Poljak-Blazi M., Egger G., Sunjic S.B., Schaur R.J., Zarkovic N. Oxidative burst and anticancer activities of rat neutrophils. *Biofactors*, 2005, Vol. 24, no. 1-4, pp. 305-312.

Авторы:

Абакумова Т.В. — к.б.н., доцент, доцент кафедры физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Генинг Т.П. — д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Долгова Д.Р. — к.б.н., доцент, доцент кафедры физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Антонеева И.И. — д.м.н., доцент, профессор кафедры онкологии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

Песков А.Б. — д.м.н., профессор, декан факультета постдипломного медицинского и фармацевтического образования ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Генинг С.О. — аспирант кафедры онкологии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

Authors:

Abakumova T.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Gening T.P., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Dolgova D.R., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Antoneeva I.I., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Oncology and Radiology, Ulyanovsk State University; Regional Center of Clinical Oncology, Ulyanovsk, Russian Federation

Peskov A.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Dean, Faculty of Postgraduate Medical and Pharmaceutical Education, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Gening S.O., Postgraduate Student, Department of Oncology and Radiology, Ulyanovsk State University; Regional Center of Clinical Oncology, Ulyanovsk, Russian Federation

Поступила 30.01.2019
Отправлена на доработку 11.03.2019
Принята к печати 05.04.2019

Received 30.01.2019
Revision received 11.03.2019
Accepted 05.04.2019

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ К НЕЙРОМЕДИАТОРАМ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Мягкова М.А., Боброва З.В., Петроченко С.Н.

ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка,
Московская обл., Россия

Резюме. Проведен сравнительный анализ естественных антител (е-Ат) к биорегуляторам системы возбуждения и торможения (глутамат и ГАМК) у людей, различающихся физической нагрузкой и длительностью ее выполнения. Объектом исследования были лица, усиленно занимающиеся: греко-римской борьбой (22 чел.), хоккеем (42 чел.). Контрольную группу составили добровольцы, выполняющие комплекс оздоровительной физкультуры (42 чел.). Содержание антител к нейромедиаторам в сыворотке крови спортсменов и физкультурников определяли методом твердофазного ИФА, используя для сорбции на планшет синтезированные конъюгированные антигены глутамата и ГАМК. При возрастании физической нагрузки, проводимой согласно тренерскому графику, в группах обследованных спортсменов обнаружено достоверное повышение уровня антител к ГАМК и глутамату по сравнению с контролем. Для спортсменов-борцов проводили поэтапное измерение антител к глутамату и ГАМК. Интервал каждого периода составлял 14 дней. Нулевая точка первого этапа характеризовалась отсутствием физической нагрузки, а в дальнейшем происходило ее нарастание. Экспериментально установлена взаимосвязь изменения иммунологических показателей с уровнем нагрузки, соответствующей различному временному периоду занятия греко-римской борьбой. В ходе спортивной подготовки наблюдается постепенное нарастание антител к указанным нейромедиаторам уже после окончания первого этапа. Однако лишь к концу третьего периода отмечено статистически достоверное изменение их уровня. У спортсменов-хоккеистов сравнительным ИФА е-Ат к глутамату и ГАМК установлено достоверное изменение уровня антител к нейромедиаторам по сравнению с параметрами для контрольной группы. Отмечены отличительные особенности содержания антител для хоккеистов по сравнению со спортсменами, занимающимися греко-римской борьбой. Содержание е-Ат к ГАМК и глутамату для группы обследованных хоккеистов был изначально достоверно выше контрольной группы и сохранялось таковым на протяжении всего тренировочного процесса. Эти результаты могут свидетельствовать о различном функциональном состоянии организма перед началом физической нагрузки. При статистической обработке полученных данных выявлены закономерности содержания антител в индивидуальных сыворотках спортсменов. Результаты анализа показали, что изначально максимальное количество хоккеистов как в покое, так и при нагрузке имеют отклонения в содержании е-Ат для ГАМК. При введении увеличенной нагрузки возрастает количество спортсменов, имеющих повышенный уровень е-Ат к глутамату. Полученные данные могут показывать степень вовлеченности регуляторных систем, в которых участвуют ГАМК и глутамат, в различные этапы физической нагрузки.

Ключевые слова: ГАМК, глутамат, физическая нагрузка, адаптация

Адрес для переписки:

Петроченко Светлана Николаевна
ФГБУН «Институт физиологически активных веществ»
Российской академии наук
117574, Россия, Москва, Новоясеневский пр., 12,
корп. 1, кв. 64.
Тел.: 8 (495) 673-39-42.
E-mail: dianark@mail.ru

Address for correspondence:

Petrochenko Svetlana N.
Institute of Physiologically Active Substances, Russian
Academy of Sciences
117574, Russian Federation, Moscow, Novoyasenevsky ave.,
12, bldg 1, apt 64.
Phone: 7 (495) 673-39-42.
E-mail: dianark@mail.ru

Образец цитирования:

М.А. Мягкова, З.В. Боброва, С.Н. Петроченко
«Сравнительный анализ естественных антител
к нейромедиаторам в условиях изменения физической
нагрузки на организм человека» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1139-1146.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1139-1146
© Мягкова М.А. и соавт., 2019

For citation:

M.A. Myagkova, Z.V. Bobrova, S.N. Petrochenko
“Comparative analysis of natural antibodies to
neurotransmitters in the conditions of changes in physical
activity on the human body”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6,
pp. 1139-1146. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1139-1146
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1139-1146

COMPARATIVE ANALYSIS OF NATURAL ANTIBODIES TO NEUROTRANSMITTERS DURING CHANGES OF PHYSICAL BODY BURDENS

Myagkova M.A., Bobrova Z.V., Petrochenko S.N.

Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

Abstract. We performed a comparative evaluation of natural antibodies (e-At) to glutamate and GABA, the bioregulators of, respectively, excitatory and inhibitory systems in the people who differ in physical activity and its duration. The study included those athletes who are intensely engaged in Greco-Roman wrestling (22 cases), ice hockey (42 cases). The control group consisted of volunteers performing a complex of fitness exercises (42 persons). The relative contents of natural neurotransmitter antibodies in blood serum was determined by the solid-phase ELISA technique, using a synthetic conjugated glutamate and GABA antigens for sorption on the analytic plates. With increasing physical activity determined by the coaching schedule, a significant increase in the level of GABA and glutamate antibodies was found in the groups subjected to strenuous exercise, compared to the controls. For wrestling athletes, a consequent measurement of glutamate and GABA antibodies was performed, with an interval of 14 days for each period. The zero point of the first stage was characterized by the absence of physical activity, being increased at later terms. We have established experimentally an interrelation between changes in immunological parameters and physical loads at different time periods of Greco-Roman wrestling. There was a gradual increase in antibodies to these neurotransmitters after the first stage of sport exercises. However, a statistically significant change in their level was observed only by the end of the third training period. In hockey players, a comparative ELISA testing of natural antibodies to glutamate and GABA showed a significant change in the level of antibodies to neurotransmitters compared with appropriate parameters of control group. We have also noted distinct features of the antibody content in hockey players if compared with Greco-Roman fighters. The content of GABA and glutamate antibodies for the group of hockey players examined was initially significantly higher than in control group, and remained on these levels throughout the entire training process. These results may indicate a different functional state of the body before exercise. Statistical evaluation of the data obtained has revealed some individual patterns of serum antibody contents in athletes. At initial terms, most hockey players, either at rest and under physical load, showed a scatter in the contents of GABA antibodies. After enhanced physical loads, the number of athletes with higher levels of glutamate antibodies was increased. The data obtained may indicate to a degree of GABA- and glutamate-dependent regulatory systems involvement into various stages of physical training.

Keywords: gamma-aminobutyric acid, glutamate, antibodies, physical burden, adaptation

Введение

В настоящее время актуальна задача разработки новых способов для определения возможности организма человека адаптироваться к изменяющимся условиям окружения. Особую важность приобретает наличие объективных лабораторных методов для их использования в процесс подготовки специалистов, работающих в экстремальных условиях. При изучении универсального механизма адаптации организма в качестве модели можно рассматривать спортивную деятельность человека, которая регламентируется физическими нагрузками [5, 4]. Для профессионального спортсмена адаптация определяется необходимостью его организма приспосабливаться к физическим нагрузкам за относительно короткий промежуток времени [5]. Пределы адаптации че-

ловека во многом обусловлены функциональной активностью биохимических процессов, которые характеризуются состоянием системы эндогенных биорегуляторов (ЭБ) [7, 14]. Известно, что занятия спортом сопровождаются значительными метаболическими перестройками, включающими изменения уровня ключевых эндогенных медиаторов, относящихся к различным гуморальным системам регуляции [1]. Устойчивость человека к различным заболеваниям, его физический и психоэмоциональный потенциал на биохимическом уровне также определяются системой ЭБ [6, 7]. При подготовке как специалистов для работы в экстремальных условиях, так и спортсменов необходимо объективно оценить адаптационные возможности организма, исключить нагрузки, приводящие к негативным последствиям

для здоровья. Однако ситуационная лабильность в уровнях эндогенных соединений систем регуляции и поддержания гомеостаза затрудняет разработку методов оценки адаптационных резервов на основе использования этих показателей [15]. В исследованиях последних лет установлено, что количественные и качественные изменения свойств ЭБ при адаптации могут отражаться и хорошо сохраняться посредством иммунологических показателей, к которым относятся естественные антитела (е-Ат), способные длительное время циркулировать в кровотоке [1, 8, 13]. Такие антитела различаются по специфичности, направленной против эндогенных макро- и низкомолекулярных антигенов [13]. Также они способны участвовать в физиологических реакциях организма, включая иммунорегуляцию, поддержание внутреннего гомеостаза, выполнение транспортной функции и модуляции действия биологически активных веществ [7, 8]. Для поддержания гомеостатического равновесия медиаторы системы возбуждения и торможения играют наиболее важную роль [12]. К ним относятся глутаминовая и гамма-аминомасляная кислоты (глутамат и ГАМК). **Цель исследования** заключалась в сравнительном определении е-Ат к ГАМК и глутамату в сыворотке крови лиц, различающихся физическими нагрузками, и установлении практического применения иммунологических показателей для оценки адаптационного ресурса организма человека.

Материалы и методы

В иммунохимических исследованиях использовали: конъюгат антивидовых антител против иммуноглобулинов человека, меченных ферментом, тетраметилбензидин, гидропирит 30%, твин-20 Sigma (США). Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) осуществляли с помощью полистирольных планшетов фирмы Nunc (Дания). Результаты ИФА учитывали при 450 нм, используя спектрофотометр фирмы Thermo (Финляндия).

В качестве объекта исследования выбраны образцы сыворотки крови спортсменов-добровольцев, имеющих регулярную физическую нагрузку. Это лица, занимающиеся греко-римской борьбой (22 человека), возраст которых составлял от 13 до 24 лет. Длительность занятия этим видом спорта соответствовала 5-14 годам. А также в эксперименте приняли участие 42 спортсмена-хоккеиста в возрасте от 20 до 24 лет. Все лица, участвующие в исследовании, имели письменное информированное согласие и прошли медицинское освидетельствование. У каждого из них отсутствовала действующая спортивная дисквалификация. Образцы сыворотки крови участников

эксперимента получены от представителей спортивной школы «Спарта» и хоккейного клуба «Динамо» (Москвы). Для исследования проводили отбор образцов сыворотки крови до спортивной нагрузки и после ее окончания. Процедуру выполняли в соответствии с планом учебно-тренировочного процесса (УТП), установленным тренером. У спортсменов-борцов были выделены три этапа забора биоматериала с интервалом 14 дней. Первый соответствовал нулевой точке и характеризовался отсутствием физической нагрузки. Два следующие периода сопровождалась увеличением физической спортивной нагрузки. У хоккеистов, которые, по оценке тренера, находились на пике спортивной формы, проводили однократный забор крови до и после нагрузки. В эксперименте использовали велоэргометр Sheller со ступенчато-возрастающим нагрузочным тестированием. Нагрузку на ступени рассчитывают с учетом массы тела спортсмена. На первой ступени она соответствовала 1Вт на кг. Далее проводили последующую нарастающую нагрузку по 50 Вт до пульса 170 уд/мин. В качестве контроля для сравнения выбрали группу из 42 здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 25 лет. Образцы сыворотки крови предоставлены фитнес-клубом «Спорт Форум» (Москвы). Указанные лица занимались оздоровительным физкультурным комплексом. В ходе эксперимента все полученные пробы сыворотки крови хранили до момента проведения анализа при температуре -20 °С.

При выполнении ИФА в качестве антигенов для иммобилизации на планшет использовали конъюгаты ГАМК (ГАМК-П) и глутамата (Глутамат-П). Синтез каждого из этих соединений, состоящего из гаптена производного глутамата или ГАМК и полимерного носителя, проводили в соответствии с разработанной нами ранее схемой [10]. Твердофазный ИФА определения антител к ГАМК и глутамату в сыворотке крови человека включал в себя следующие стадии. Иммобилизацию на полистирольный планшет комплекса синтетического антигена глутамата и ГАМК. Концентрация при этом составила для Глутамат-П 2 мкг/мл, а для ГАМК-П 5 мкг/мл. Сорбцию проводили в 0,02 М карбонатном буфере (рН 9,5) в течение 24 часов при температуре 4 °С. Далее выполняли операции аналогично [6], а именно связывание указанного выше антигена с антителами, присутствующими в анализируемом образце; обнаружение иммунного комплекса, образовавшегося в ходе взаимодействия с антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой хрена; дальнейшее измерение активности фермента в полученном иммунном комплексе. Результаты проведенного исследования оценивали статистически, применяя

среднюю арифметическую величину (М) и стандартную ошибку (m). Анализ различий показателей до и после нагрузки проводили при помощи парного критерия Стьюдента. Для принятия гипотезы применяли уровень достоверности 95% ($p = 0,05$).

Результаты и обсуждение

Поддержание гомеостаза сопровождается активизацией и мобилизацией функциональных ресурсов организма, включением цепочки явлений, основанной на общих нейроиммунологических механизмах. Уровень эффективности деятельности человека в экстремальных условиях, сопряженных с физическими нагрузками, связан с его адаптационными возможностями, основанными на состоянии регуляторных систем. Наиважнейший из них является гамкергическая. Именно этот факт определил выбор панели антигенов для иммунологических исследований. Биохимическую функцию указанная система реализует с помощью ЭБ, активно взаимодействующих с иммунной системой через рецепторы на иммунокомпетентных клетках. Известно, что глутамат и ГАМК относятся к медиаторам физиологических процессов активации и торможения, обеспечивая биохимическую связь головного мозга, нейроэндокринной и иммунной систем [2, 3]. В результате каскада реакций происходит специфическое изменение показателей гуморальных факторов иммунитета — е-Ат, отражающих состояние регуляторных систем.

Иммунологические исследования включали сравнительный анализ е-Ат к ГАМК и глутамату в сыворотке крови спортсменов, различающихся по физической нагрузке, и представителей контрольной группы, занимающихся спортивно оздоровительной физкультурой. Результаты ИФА антител к глутамату, ГАМК в сыворотке крови греко-римских борцов для трех этапов обследования с интервалом 14 дней представлены таблице 1.

Анализ данных иммунологического мониторинга показал отличие уровня е-Ат в группе спортсменов от контроля (табл. 1). Так, для первого дня отбора крови средние показатели уровня е-Ат по группе спортсменов не отличались от нормы. По истечении 14 дней с увеличением физической нагрузки в соответствии с планом тренера прослеживается тенденция к возрастанию содержания е-Ат к глутамату, ГАМК по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, что статистически значимое изменение уровня е-Ат к указанным ЭБ наблюдается к 28 дню от начала тренировки. Известно, что уровень е-Ат связан с изменением концентрации самих антигенов, которыми и являются указанные ЭБ. По-

этому одновременное увеличение по сравнению с контролем уровня антител к ЭБ торможения и возбуждения (ГАМК и глутамату) у спортсменов свидетельствует о важности участия этих систем в адаптации к нагрузкам и их сбалансированности [6, 11].

Изучена взаимосвязь изменения иммунологических показателей с уровнем нагрузки, соответствующей различному временному периоду занятия греко-римской борьбой. Исследованы три группы. В первую вошли лица со спортивным стажем от 11 до 14 лет. Вторую составили спортсмены, занимающиеся борьбой от 8 до 10 лет. Третью представляли борцы с наименьшим временем занятия от 5 до 7 лет. Анализ образцов для перечисленных групп проводили в 3 этапа аналогично описанному. Результаты представлены в таблице 2.

Результаты определения е-Ат к указанным выше антигенам позволили установить диагностическую значимость их практического применения. Так, на втором этапе выявлено достоверное изменение уровня е-Ат только к ГАМК в группе борцов с наименьшим стажем занятия спортом (5-7 лет). То есть можно предположить, что скорость изменения ЭБ в гамкергической системе связана с длительностью получения физической нагрузки. К третьему этапу тренировки, соответственно увеличению нагрузки, обнаружено одновременное увеличение содержания е-Ат к глутамату и ГАМК для трех групп спортсменов, которое уже не зависело от стажа занятия борьбой. Основываясь на заключении тренера, спортсмены именно в этот период приобретают стабильную физическую форму. У них снижен уровень стресса, улучшено настроение, уменьшено беспокойство, что и способствует спокойному сну.

Проведен сравнительный ИФА е-АТ к глутамату и ГАМК у хоккеистов и контрольной группы. Установлено, что в группе хоккеистов уровень е-Ат к нейромедиаторам изменялся по сравнению с параметрами для контрольной группы. Можно отметить отличительные особенности содержания антител для хоккеистов по сравнению со спортсменами, занимающимися греко-римской борьбой. Уровень антител был изначально достоверно выше контрольной группы ($0,73 \pm 0,12$ и $0,79 \pm 0,15$ при $*p = 0,0001$) и сохранялся таковым при увеличении физической нагрузки ($1,08 \pm 0,21^*$ и $1,03 \pm 0,11^*$ к глутамату и ГАМК соответственно). Эти результаты показывают различие в функциональном состоянии организма перед началом физической нагрузки. При статистической обработке полученных данных выявлены закономерности содержания антител в индивидуальных сыворотках крови спор-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ (OD₄₅₀ ИФА (M±m)) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ОБСЛЕДУЕМЫХ СПОРТСМЕНОВ, ЗАНИМАЮЩИХСЯ ГРЕКО-РИМСКОЙ БОРЬБОЙ

TABLE 1. INDICATORS OF NATURAL ANTIBODIES (OD₄₅₀ ELISA (M±m)) IN SERUM OF THE SURVEYED ATHLETES ENGAGED IN GRECO-ROMAN WRESTLING

Показатель Indicator	Контрольная группа Control group (n = 22)	Обследуемая группа, этап Survey group, stage (n = 22)		
		1	2	3
е-Ат к ГАМК n-Ab GABA	0,77±0,09	0,86±0,14	0,94±0,10	1,05±0,15*
е-Ат к глутамату n-Ab glutamate	0,81±0,09	0,79±0,16	0,92±0,12	1,19±0,13*

Примечание. * – p < 0,05 по отношению к контрольной группе.

Note. *, p < 0.05 in relation to control group.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (OD₄₅₀ В ИФА (M±m)) В ГРУППАХ С РАЗЛИЧНЫМИ СРОКАМИ ЗАНЯТИЯ ГРЕКО-РИМСКОЙ БОРЬБОЙ

TABLE 2. INDICATORS OF NATURAL ANTIBODIES IN BLOOD SERUM (OD₄₅₀ IN ELISA (M±m)) IN GROUPS WITH DIFFERENT PERIODS OF GRECO-ROMAN WRESTLING

Показатель Indicator		е-Ат к ГАМК n-Ab GABA	е-Ат к глутамату n-Ab glutamate
Контрольная группа Control group n = 22		0,77±0,09	0,81±0,09
1 группа (11-15 лет) 1 st group (11-15 years) n = 8	1 этап 1 st stage	0,83±0,09	0,78±0,07
	2 этап 2 nd stage	0,91±0,06	0,93±0,15
	3 этап 3 rd stage	1,19±0,11*	1,21±0,07*
2 группа (8-10 лет) 2 nd group (8-10 years) n = 4	1 этап 1 st stage	0,89±0,08	0,75±0,11
	2 этап 2 nd stage	0,81±0,12	0,99±0,07
	3 этап 3 rd stage	1,08±0,15*	1,10±0,12*
3 группа (5-7 лет) 3 rd group (5-7 years) n = 10	1 этап 1 st stage	0,87±0,13	0,81±0,07
	2 этап 2 nd stage	1,02±0,12*	0,91±0,08
	3 этап 3 rd stage	1,14±0,15*	1,21±0,08*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

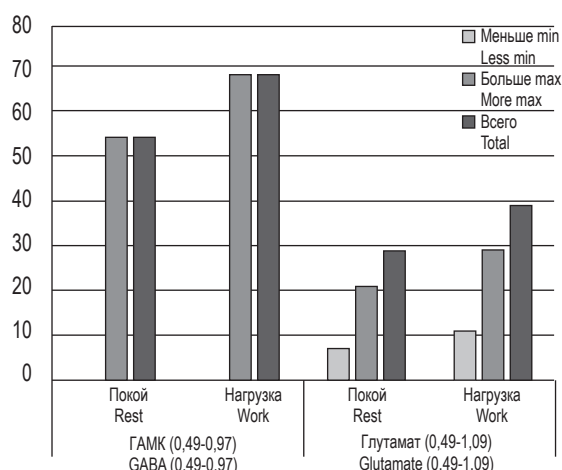


Рисунок 1. Количество спортсменов (в %) с измененным уровнем антител к ГАМК и глутамату в состоянии покоя и после физической нагрузки в группе хоккеистов

Figure 1. Number of athletes (in %) with altered levels of antibodies to GABA and glutamate at rest and after exercise in a group of hockey players

тсменов. По характеру зависимости изменения содержания антител к исследуемому антигену условно можно выделить три группы. Это категории лиц отличающиеся пониженным, повышенным и соответствующим контрольной группе содержанием антител. Представлены данные (рис. 1) для хоккеистов, имеющих в ИФА достоверное отклонение уровня е-Ат к ГАМК и глутамату по сравнению с контрольной группой, выраженное в процентах.

Результаты анализа показали, что изначально максимальное количество хоккеистов как в покое, так и при нагрузке имеют отклонения в содержании е-Ат для ГАМК. При введении увеличенной нагрузки возрастает количество спортсменов, имеющих повышенный уровень е-Ат к глутамату.

Таким образом, новый метод измерения диагностически значимых иммунологических показателей для оценки функционального состояния организма человека поможет в выборе оптимального учебно-тренировочного процесса как для оценки нахождения человека в экстремальных ситуациях, так и в спортивной деятельности, позволяя достичь максимального результата.

Список литературы / References

1. Высочин Ю.В., Денисенко Ю.П. Современные представления о физиологических механизмах срочной адаптации организма спортсменов к воздействиям физических нагрузок // Теория и практика физической культуры, 2002. № 7. С. 2-6. [Vysochin Yu.V., Denisenko Yu.P. Modern ideas on physiological mechanisms of urgent adaptation of sportsmen organisms to impacts of physical stress. *Teoriya i praktika fizicheskoy kultury = Theory and Practice of Physical Culture*, 2002, no. 7, pp. 2-6. (In Russ.)]
2. Гаврилова Е.А. Вариабельность ритма сердца и спорт. Прогноз функционального состояния и соревновательной деятельности спортсменов. Palmarium Academic Publishing, 2017. 180 с. [Gavrilova E.A. Heart rate variability and sports]. Palmarium Academic Publishing, 2017. 180 p.
3. Евтух А.В., Квашук П.В., Шустин Б.Н. Научно-методические основы многолетней подготовки спортсменов // Вестник спортивной науки, 2008. № 4. С.16-19. [Evtukh A.V., Kvashuk P.V., Shustin B.N. Scientific-methodical bases of long-term preparation of athletes. *Vestnik sportivnoy nauki = Bulletin of Sports Science*, 2008, no. 4, pp. 16-19. (In Russ.)]
4. Келина Н.Ю., Куликова О.А., Петроченко С.Н., Мягкова М.А. Современное состояние проблемы определения болезни как результата нарушений адаптации организма // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс, 2014, № 1 (17). С. 196-200. [Kelina N.Yu., Kulikova O.A., Petrochenko S.N., Myagkova M.A. Current state of the problem of determining the disease as a result of violations of adaptation of the organism. *XXI vek: itogi proshlogo i problemy nastoyashchego plus = XXI Century: Results of the Past and Problems of the Present Plus*, 2014, no. 1 (17), pp. 196-200. (In Russ.)]
5. Кучерявый В.В. Физиология с основами биохимии. Курс лекций для колледжа физической культуры. 2-е изд., доп. и испр. ВИНТИ, 2012. 163 с. [Kucheryavyy V.V. Physiology with the basics of biochemistry. Course of lectures for the college of physical culture. 2nd ed.). Moscow: All-Russian Institute for Scientific and Technical Information, 2012. 163 p.
6. Мягкова М.А., Петроченко С.Н., Морозова В.С., Мосейкин И.А., Шипицын В.В., Поливьяная О.Ю. Антитела к эндогенным биорегуляторам и их связь с возрастными и гендерными особенностями хронического болевого синдрома // Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова, 2013, № 4. С. 41-44. [Myagkova M.A., Petrochenko S.N., Morozova V.S., Moseykin I.A., Shipitsyn V.V., Polyvyanaya O.Yu. Antibodies to endogenous bioregulators and their relationship with age and gender characteristics of chronic pain syndrome. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2013, no. 4, pp. 41-44. (In Russ.)]

7. Мягкова М.А., Морозова В.С. Естественные антитела и их физиологические функции // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология, 2014. № 3. С. 75-81. [Myagkova M.A., Morozova V.S. Natural antibodies and their physiological functions. *Immunopathology. Allergology. Infectology*, 2014, no. 3, pp. 75-81. (In Russ.)]
8. Мягкова М.А., Морозова В.С. Иммунохимические свойства естественных антител к физиологически активным соединениям // Фундаментальные исследования, 2014. № 11, ч. 5. С. 1066-1070. [Myagkova M.A., Morozova V.S. Immunochemical properties of natural antibodies to biologically active compounds. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2014, no. 11, Pt 5, pp. 1066-1070. (In Russ.)]
9. Пальцев М.А., Полетаев А.Б., Сучков С.В. Аутоиммунитет и аутоиммунный синдром: границы нормы и патологии // Вестник РАМН, 2010. № 8. С. 1-3. [Paltsev M.A., Poletaev A.B., Suchkov S.V. Autoimmunity and autoimmunity, the boundaries of norm and pathology. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2010, no. 8, pp. 1-3. (In Russ.)]
10. Петроченко С.Н., Боброва З.В., Мягкова М.А., Спасский А.А., Ледовской С.М., Ильина А.К., Михайлов А.А. Определение антител к эндогенным биорегуляторам для оценки функционального состояния здоровья спортсменов // Клиническая лабораторная диагностика, 2017. Т. 62, № 2. С. 346-350. [Petrochenko S.N., Bobrova Z.V., Myagkova M.A., Spassky A.A., Ledovskaya S.M., Ilyin A.K., Mikhailov A. Determination of antibodies to endogenous bioregulators for the evaluation of the functional state of health of athletes. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, Vol. 62, no. 2, pp. 346-350. (In Russ.)]
11. Поливьяная О.Ю., Левашова А.И., Морозова В.С., Петроченко С.Н., Мягкова М.А., Мосейкин И.А. Уровни переносимости боли и факторы гуморального иммунитета при дорсалгии // Вестник РАМН, 2015. № 1. С. 118-124. [Polyvyayana O.Yu., Levashova A.I., Morozova V.S., Petrochenko S.N., Myagkova M.A., Moseykin I.A. Levels of pain tolerance and factors of humoral immunity in dorsalgia. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, Vol. 1, pp. 118-124. (In Russ.)]
12. Hegadoren K.M., O'Donnell T., Lanius R., Coupland N.J., Lacaze-Masmonteil N. The role of beta-endorphin in the pathophysiology of major depression. *Neuropeptides*, 2009, Vol. 43, no. 5, pp. 341-353.
13. Madi A., Hecht I., Bransburg-Zabary S., Merbl Y., Pick A., Zucker-Toledano M. Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, pp. 14484-14489.
14. Mostafa G.A., Ibrahim D.H., Shehab A.A., Mohammed A.K. The role of measurement of serum autoantibodies in prediction of pediatric neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *J. Neuroimmunol.*, 2010, Vol. 227, pp. 195-201.
15. Poletaev A.B., Stepanyuk V.L., Gershwin M.E. Integrating immunity: the immunculus and self-reactivity. *J. Autoimmun.*, 2008, Vol. 30, pp. 68-73.

Авторы:

Мягкова М.А. — д.б.н., профессор, заведующая лабораторией иммунохимии ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

Боброва З.В. — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

Authors:

Myagkova M.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

Bobrova Z.V., Junior Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

Петроченко С.Н. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

Petrochenko S.N., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

Поступила 24.06.2019
Отправлена на доработку 13.09.2019
Принята к печати 22.10.2019

Received 24.06.2019
Revision received 13.09.2019
Accepted 22.10.2019

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ К ГРИППУ И ТЯЖЕЛЫЕ СЛУЧАИ ЗАБОЛЕВАНИЯ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2018-2019 гг.

Ильичева Т.Н.¹, Дурьманов А.Г.¹, Иванова Е.В.², Жирнов В.А.³,
Епанчинцева А.В.¹, Святченко С.В.¹, Торжкова П.Ю.¹,
Буланович Ю.А.¹, Рыжиков А.Б.¹

¹ ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

² ФБУН «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» Роспотребнадзора, г. Новосибирск, Россия

³ ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. Цель работы — исследование популяционного иммунитета к вирусам гриппа населения России осенью 2018 г., анализ тяжелых случаев заболевания в течение эпидемического сезона 2018-2019 гг. и подтвержденных случаев гриппа у вакцинированных. Исследовано 1835 образцов сыворотки крови. Ни один из образцов не реагировал в РТГА с высокопатогенными вирусами А(Н5N8) и А(Н7N9). От 41 до 58% образцов сывороток в зависимости от региона сбора имели значимые титры антител (40 и выше) против вакцинного штамма A/Michigan/45/2015 (H1N1pdm09). 40-63% тех же сывороток были положительными к эпидемическому штамму A/Lipetsk/1V/2018 (H1N1pdm09), выделенному в начале эпидемического сезона (26.11.2018). От 26 до 46% образцов были серопозитивными в отношении вакцинного штамма A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) и от 10 до 23% — в отношении вируса гриппа В генетической линии Ямагата. В эпидемическом сезоне 2018-2019 гг. тяжелые случаи гриппа вызывали в основном вирусы гриппа А с преобладанием штаммов А/Н1N1pdm09 (52,5%). На долю вирусов гриппа В пришлось 3% заболеваний. Было подтверждено 217 случаев гриппа со смертельным исходом, из них около половины (44,7%) заболеваний пришлось на возрастную группу людей 60 лет и старше, 29% — на возрастную группу 46-59 лет. Восемь случаев (3,7%) смерти от гриппа были зафиксированы у вакцинированных гриппозной вакциной накануне эпидсезона. Более 75% умерших от гриппа имели сопутствующие заболевания, наиболее распространенные среди них — сердечно-сосудистые, ожирение, диабет, заболевания мочевыделительной системы, инфекционные болезни (ВИЧ, гепатиты). Таким образом, в профилактике гриппа вакцинация остается самым эффективным средством, особенно это касается групп риска. Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ГЗ-1/16 и ГЗ-2/18.

Ключевые слова: вирус гриппа, популяционный иммунитет, реакция торможения гемагглютинации, защитные титры антител, смертность от гриппа, группы риска

Адрес для переписки:

Ильичева Татьяна Николаевна
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“»
630559, Россия, Новосибирская обл., р. п. Кольцово.
Тел.: 8 (383) 363-47-00 (доб. 26-88).
Факс: 8 (383) 336-74-09.
E-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru

Address for correspondence:

Ilyicheva Tatyana N.
State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector"
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo.
Phone: 7 (383) 363-47-00 (add. 26-88).
Fax: 7 (383) 336-74-09.
E-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru

Образец цитирования:

Т.Н. Ильичева, А.Г. Дурьманов, Е.В. Иванова, В.А. Жирнов, А.В. Епанчинцева, С.В. Святченко, П.Ю. Торжкова, Ю.А. Буланович, А.Б. Рыжиков «Гуморальный иммунитет к гриппу и тяжелые случаи заболевания в эпидемическом сезоне 2018-2019 гг.» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1147-1154.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1147-1154
© Ильичева Т.Н. и соавт., 2019

For citation:

T.N. Ilyicheva, A.G. Durymanov, E.V. Ivanova, V.A. Zhirnov, A.V. Epanchintseva, S.V. Syvatchenko, P.Yu. Torzhkova, Yu.A. Bulanovich, A.B. Ryzhikov "Humoral immunity to influenza and severe influenza cases in Russia in 2018-2019", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1147-1154.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1147-1154

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1147-1154

HUMORAL IMMUNITY TO INFLUENZA AND SEVERE INFLUENZA CASES IN RUSSIA IN 2018-2019

Ilyicheva T.N.^a, Durymanov A.G.^a, Ivanova E.V.^b, Zhirnov V.A.^c,
Epanchintseva A.V.^a, Svyatchenko S.V.^a, Torzhkova P.Yu.^a,
Bulanovich Yu.A.^a, Ryzhikov A.B.^a

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

^b Center for Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk Region, Novosibirsk, Russian Federation

^c I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. The aim of our work was to investigate the herd immunity to influenza viruses among population of Russia during autumn 2018; evaluation of severe cases of the infection over the season of 2018-2019 epidemics, and confirmed cases of influenza in vaccinated persons. A total of 1835 samples of blood serum were studied. Neither sample did react in hemagglutination inhibition test with highly pathogenic A(H5N8) and A(H7N9) viral strains. 41 to 58% of samples, dependent on sampling region, showed significant antibody titers (> 40) against против вакцинного штамма the vaccinal A/Michigan/45/2015 strain (H1N1pdm09). 40 to 63% of the same sera were positive for epidemic A/Lipetsk/1V/2018 strain (H1N1pdm09), isolated at the start of epidemic season (26.11.2018). From 26 to 46% of the samples were seropositive towards vaccinal strain A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), and 10 to 23% towards Yamagata influenza B genetic strain. Severe influenza cases during the 2018-2019 epidemic season were caused, mainly, by influenza A virus, with predominance of A/H1N1pdm09 (52.5%), with only 3% of cases caused by influenza A viruses. 217 cases of influenza with lethal outcome were confirmed, of them about a half of these cases (44.7%) affected older persons (> 60 years old), 29% were diagnosed in the group of 46-59 years old. Eight lethal cases of influenza infection (3.7%) were documented in the persons vaccinated before the vaccination season. Over 75% of patients with lethal influenza cases had concomitant diseases, with cardiovascular disorders, obesity, diabetes, urogenital diseases, infectious diseases (HIV, hepatitis) being most often. Hence, vaccination against influenza remains the most effective protective tool, especially in the risk groups. The study was performed in the frames of the state task contract (ГЗ-1/16 and ГЗ-2/18).

Keywords: influenza virus, herd immunity, hemagglutination inhibition test, antibody protective titers, influenza death rate, risk groups

Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ГЗ-1/16 и ГЗ-2/18.

Введение

В 1943 году первое исследование эффективности инактивированной вакцины против гриппа продемонстрировало, что титры сывороток крови в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) были связаны с защитой как у вакцинированных, так и у непривитых людей [5]. В том исследовании 50% заболеваний гриппом были зафиксированы у людей с обратной величиной титра ниже 64; немногие переболевшие лица в вакцинированной группе имели титры ниже 128, и небольшое количество инфекций произошло у людей с титрами ≤ 1024 . Другое исследование, проведенное в армии США вскоре после этого, также продемонстрировало, что антитела против гемагглютинина (НА) являются основным определяющим фактором защиты; однако

титры, связанные с защитой, были ниже, чем те, которые были описаны в предыдущем исследовании [13]. Не было отмечено клинических проявлений заболевания у лиц, если титр в РТГА перед инфицированием составлял по меньшей мере 32. Из 8 человек, вакцинированных гриппозной вакциной, которые были впоследствии инфицированы, только один имел титр 64; все остальные имели титры равными или ниже 32. В большом исследовании Hobson D. и соавт. также было установлено, что титры в РТГА около 40 и выше обеспечивают защиту от инфекции [6]. В результате этих и более поздних исследований было признано, что титр в РТГА ≥ 40 обеспечивает 50% защиту от распространения эпидемии. В современном исследовании было показано, что в полностью смешанной популяции передача вируса гриппа от человека к человеку может быть прервана, если около 52% населения будут иметь титры равные или выше 40 к этому или родственным

штаммам [2]. В связи с этим Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует проводить ежегодную вакцинацию с охватом около 50% населения, а для групп риска этот показатель должен быть еще выше (не ниже 75%) [21]. Метод РТГА используется как золотой стандарт для исследования популяционного иммунитета населения, для оценки вакцинопрофилактики [15, 16].

Накануне эпидемического сезона 2018-2019 гг. в Российской Федерации было вакцинировано 70,8 млн чел. (около 49% населения страны), в том числе 17 млн детей [1].

Целью настоящей работы явилось исследование гуморального иммунитета к вирусам гриппа населения России осенью 2018 г., анализ тяжелых случаев заболевания в течение эпидемического сезона 2018-2019 гг. и подтвержденных случаев гриппа у вакцинированных.

Материалы и методы

Сыворотки крови были собраны в Центрах гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора накануне эпидемического сезона, в октябре-декабре 2018 г. Места сбора расположены недалеко от пролетных путей и мест размножения диких водоплавающих птиц. Сбор сывороток от здоровых доноров, транспортировка материала в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и методика РТГА выполнялись, как описано ранее [7].

В работе использовали диагностикумы гриппозные для проведения реакции торможения геагглютинации сухие, производства ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов» (Санкт-Петербург), изготовленные на основе следующих штаммов вирусов гриппа А и В: A/Michigan/45/2015 (H1N1pdm09),

A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), B/Phuket/3073/2013 (Yamagata lineage), B/Colorado/06/2017 (B/Victoria). Кроме того, были использованы антигены собственного изготовления на основе вирусного штамма A/Anhui/01/2013 (H7N9), любезно предоставленного Сотрудничающим центром ВОЗ в Пекине, Китай; вирусного штамма A/great crested grebe/Tyva/34/2016 (H5N8), выделенного авторами в 2016 году в Западной Сибири [11], вирусного штамма A/Lipetsk/1V/2018 (H1N1pdm09), выделенного авторами из клинического материала (мазок из зева) в ноябре 2018 г. (идентификационный номер в базе данных GISAID – EPI_ISL 332797). Антигены были изготовлены из вирусосодержащей культуральной жидкости обработкой бета-пропиолактоном (BPL, Acros Organics, США). Для этого непосредственно перед использованием разводили исходный 98% раствор BPL холодной (4 °C) дистиллированной водой до 2% раствора BPL. Смешивали 1 часть 0,5 М раствора Na_2HPO_4 с 38 частями вирусосодержащей жидкости, затем по каплям добавляли 1 часть 2,0% BPL, используя мешалку. Прогревали суспензию на водяной бане в течение двух часов при 37 °C, доводили pH до 7,3-7,4, используя 7% раствор Na_2HCO_3 . Хранили готовый антиген при 4 °C.

Первичный клинический и аутопсийный материал в случаях заболевания вакцинированных, летальных случаях гриппа и тяжелом течении болезни собирали и тестировали в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) сотрудники региональных центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. Все положительные образцы поступали в ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Все аутопсийные образцы и клинические образцы от вакцинированных повторно анализировали методом ПЦР

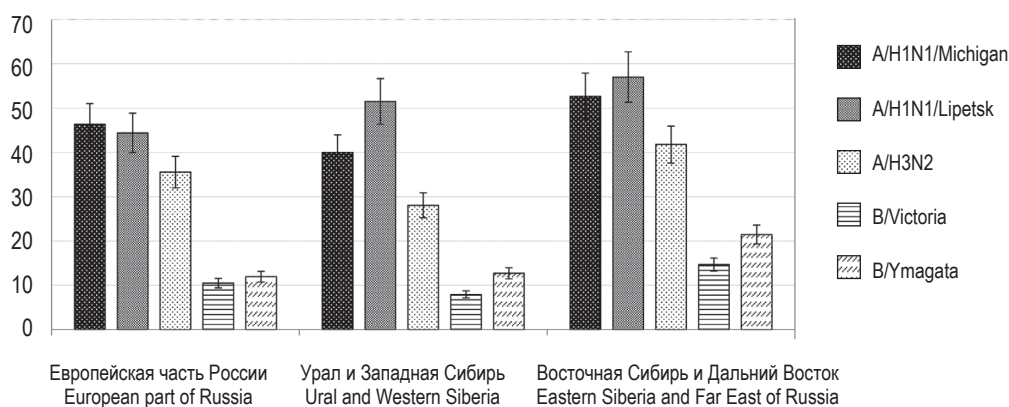


Рисунок 1. Доля (%) сывороток крови, собранных осенью 2018 г., имеющих значимые титры в РТГА (40 и выше) со штаммами вирусов гриппа А и В

Figure 1. Share (%) of blood sera (collected in the fall of 2018) having significant HI titers (40 and above) with A and B influenza viruses

с использованием наборов реагентов «РИБО-сорб», «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» и «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва).

Для определения статистической значимости различий в титрах РТГА между группами пациентов разных регионов использовался критерий χ^2 . Расчет проводился с помощью статистического программного пакета Statistica 6.0. Значение $p < 0,05$ считалось значимым.

Результаты

Для оценки популяционного иммунитета к вирусам гриппа А и В накануне эпидемического сезона было собрано 1835 образцов сыворотки крови от здоровых доноров. Ни один из образцов сыворотки, даже в разведении 1:10, не реагировал в РТГА с антигенами высокопатогенных вирусов гриппа птиц А(Н5N8) и А(Н7N9). Поскольку образцы собирались в местах пролетных путей

и размножения диких водоплавающих птиц, отсутствие антител к птичьим вирусам гриппа позволяет заключить, что широкой адаптации вирусов А(Н5N8) и А(Н7N9) к человеку пока нет.

Результаты тестирования сывороток с вакцинальными и эпидемическими штаммами представлены на рисунке 1.

Для образцов сывороток, положительных к вакцинному штамму А/Michigan/45/2015 (H1N1pdm09), доверительный интервал на уровне значимости 5% составил от 41 до 58%. Несколько большее количество (40-63%) тех же сывороток были положительными к эпидемическому штамму А/Lipetsk/1V/2018 (H1N1pdm09), выделенному нами в самом начале эпидемического сезона (26.11.2018). Это может быть связано с тем, что в предыдущем сезоне (2017-2018 гг.) циркулировали вирусы, родственные штамму А/Lipetsk/1V/2018, и сыворотки переболевших дали некоторое увеличение доли серопозитивных в отношении эпидемического штамма.

ТАБЛИЦА 1. ДАННЫЕ О ПАЦИЕНТАХ С ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ ГРИППОМ В 2018-2019 гг.

TABLE 1. DATA ON PATIENTS WITH SEVERE INFLUENZA DISEASE IN 2018-2019

Группа Group	Тяжелые случаи с благоприятным исходом Severe cases	Подтвержденные случаи гриппа с летальным исходом Fatal cases
Пол Sex		
мужской М	408	96
женский F	535	111
Пол неизвестен Unknown	80	10
Возраст (лет) Age group		
0-2	96	6
3-10	191	12
11-18	99	1
19-30	173	6
31-45	170	29
46-59	118	63
≥ 60	116	98
Возраст неизвестен Age not known	60	2
Беременные женщины Pregnant women	156	2
Вакцинированные в 2018 г. People vaccinated against influenza in 2018	236	8
Всего Total	1023	217

ТАБЛИЦА 2. ДАННЫЕ ПЦР-АНАЛИЗА ПЕРВИЧНОГО МАТЕРИАЛА (АУТОПСИЙНЫЕ ОБРАЗЦЫ, МАЗКИ ИЗ НОСА И ЗЕВА)

TABLE 2. DATA OF PCR ANALYSIS OF PRIMARY MATERIAL (AUTOPSY SAMPLES, NASAL AND PHARYNGEAL SWABS)

	A/H1N1pdm09	A/H3N2	Грипп А нетипированный Influenza A not subtyped	Грипп В Influenza B	Нет данных ПЦР No PCR data	Результаты повторного ПЦР-анализа отрицательные Results of repeated PCR analysis are negative
Количество Number	651	358	49	38	140	4
%	52,5	28,8	4,0	3,0	11,3	0,3

От 26 до 46% образцов были серопозитивными в отношении вакцинного штамма A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2). Значительно ниже (от 9 до 24% серопозитивных) был гуморальный иммунитет накануне эпидемии в отношении вируса гриппа В.

В Российской Федерации эпидподъем начался на 3-4 неделях 2019 г., имел умеренную географическую распространенность и интенсивность: даже на пике эпидемии (6 неделя 2019 г.) показатель заболеваемости составил 83,1 случай на 10 тыс. населения [1]. В таблице 1 представлены данные о подтвержденных тяжелых случаях гриппа и подтвержденных заболеваниях вакцинированных в эпидемическом сезоне 2018-2019 гг.

Около половины (44,7%) заболеваний со смертельным исходом пришлось на возрастную группу людей 60 лет и старше, 29% — на возрастную группу 46-59 лет. Восемь случаев (3,7%) смерти от гриппа были зафиксированы у вакцинированных гриппозной вакциной накануне эпидсезона. Более 75% умерших от гриппа имели сопутствующие заболевания, наиболее распространенные среди них — сердечно-сосудистые, ожирение, диабет, заболевания мочевыделительной системы, инфекционные болезни (ВИЧ, гепатиты).

В таблице 2 представлены данные о типах/субтипах вирусов гриппа, вызвавших тяжелые формы заболевания, в том числе со смертельным исходом, в эпидемическом сезоне 2018-2019 гг.

Как видно из данных таблицы 2, тяжелые случаи заболевания вызывали в основном вирусы гриппа А с преобладанием штаммов A/H1N1pdm09. На долю вирусов гриппа В пришлось 3% тяжелых заболеваний, что соответствует доле (около 2%) циркулировавших вирусов гриппа В в Российской Федерации в сезоне 2018-2019 гг. (www.who.int/flunet).

Известно, что риск тяжелого течения заболевания гриппом связан с возрастом, он выше для пожилых людей и младенцев. Так, риск летального исхода почти удваивается для лиц в воз-

расте 75 лет и старше по сравнению с людьми в возрасте 65-74 лет [8]. Во многих случаях грипп не признается основной причиной смерти. Однако современные модели выявили связанную с гриппом повышенную смертность у пожилых людей, страдающих целым рядом хронических заболеваний, включая сердечно-сосудистые заболевания, диабет, новообразования и заболевания почек [4, 22]. Кроме того, иммунный ответ на вакцинацию у пожилых людей снижается по сравнению с более молодыми взрослыми, что может влиять на эффективность вакцин в этой группе населения [18].

Показано, что самый высокий уровень заболеваемости и осложнений, связанных с гриппом, приходится на детей в возрасте 0-5 лет [15]. Часто встречаются бактериальные и другие осложнения гриппа, особенно у детей младше 3 лет, с гриппом может быть связана внезапная детская смертность [19]. Исследование Black S. и соавт. показало, что титр сывороток крови детей в РТГА, равный 110, был связан с 50% защитой от инфекции в течение всего сезона, а титры 215, 330 и 629 обеспечивали степень защиты 70, 80 и 90% соответственно. Титр, который считается защитным для взрослого человека — 40, был связан только с 22% защитой у детей [2].

Другая группа риска — беременные женщины. Эпидемиологические исследования показывают, что риск тяжелой инфекции выше среди беременных женщин по сравнению с небеременными [14], повышенная материнская и внутриутробная смертность были документированы во время пандемии 2009 года [18].

Ряд клинических испытаний и обсервационных исследований показал, что инактивированная гриппозная вакцина иммуногенна, эффективна и безопасна для беременных женщин [10]. Материнские антитела, продуцируемые в ответ на вакцину, проникают через плаценту и могут обеспечивать защиту младенца до 6-месячного возраста. Хотя перенос антител происходит наи-

более эффективно в третьем триместре беременности [17], недавнее клиническое исследование показало, что не было различий в материнской сероконверсии или соотношении материнских и детских антител в зависимости от срока вакцинации [9]. Исследование, проведенное в Великобритании в 2013–2014 гг., показало, что вакцинация во время беременности обеспечивала 71% эффективность в профилактике гриппозной инфекции [18].

Заключение

Таким образом, в профилактике гриппа вакцинация остается самым эффективным средством. В связи с этим стоит обратить внимание, что антигенный дрейф вирусов гриппа A(H1N1pdm09) и A(H3N2) привел к тому, что Всемирная организация здравоохранения рекомендовала заменить сразу два вакцинных штамма в гриппозной вакцине 2019–2020 гг. Вместо A/Michigan/45/2015 (H1N1pdm09) и A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) рекомендовано использовать штаммы, по-

добные A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09 и A/Kansas/14/2017 (H3N2) [20]. Штаммы вируса, родственные A/Kansas/14/2017, на территории России выделялись в 2018–2019 гг. крайне редко, а это означает, что против подобных штаммов у населения РФ иммунитет низкий. Кроме того, популяционный иммунитет к гриппу В накануне эпидсезона 2018–2019 гг. был на уровне 9–24% серопозитивных, а циркуляция штаммов В/Виктория и В/Ямагата в течение этого сезона была незначительной (менее 2% от всех подтвержденных случаев) (www.who.int/flunet). Следовательно, социально значимые последствия от эпидемии гриппа в 2019–2020 гг. во многом будут зависеть от кампании по вакцинации населения осенью 2019 года.

Благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность коллегам из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» субъектов РФ за сбор и своевременную и качественную доставку в ГНЦ ВБ «Вектор» клинических образцов.

Список литературы / References

1. Коллегия Роспотребнадзора по итогам эпидсезона гриппа и ОРВИ 2018–2019 гг. [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=11806. [Board of Rospotrebnadzor following the results of the influenza epidemic and SARS 2018–2019 [Electronic resource]. Access mode: https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=11806].
2. Black S., Nicolay U., Vesikari T., Knuf M., del Giudice G., Della Cioppa G. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated influenza vaccines in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2011, Vol. 30, no. 12, pp. 1081–1085.
3. Chowell G., Miller M.A., Viboud C. Seasonal influenza in the United States, France, and Australia: transmission and prospects for control. *Epidemiol. Infect.*, 2008, Vol. 136, no. 6, pp. 852–864.
4. Foppa I.M., Cheng P.Y., Reynolds S.B., Shay D.K., Carias C., Bresee J.S., Kim I.K., Gambhir M., Fry A.M. Deaths averted by influenza vaccination in the US during the seasons 2005/06 through 2013/14. *Vaccine*, 2015, Vol. 33, no. 26, pp. 3003–3009.
5. Francis T., Salk J.E., Pearson H.E., Brown P.N. Protective effect of vaccination against induced influenza A. *J. Clin. Invest.*, 1945, Vol. 24, no. 4, pp. 536–546.
6. Hobson D., Curry R.L., Beare A.S., Ward-Gardner A. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J. Hyg. Camb.*, 1972, Vol. 70, no. 4, pp. 767–777.
7. Ilyicheva T., Durymanov A., Susloparov I., Kolosova N., Goncharova N., Svyatchenko S., Petrova O., Bondar A., Mikheev V., Ryzhikov A. Fatal cases of seasonal influenza in Russia in 2015–2016. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 10, e0165332. doi: 10.1371/journal.pone.0165332.
8. Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*, 2017, Vol. 391, no. 10127, pp. 1285–1300.
9. Katz J., Englund J.A., Steinhoff M.C., Khatry S.K., Shrestha L., Kuypers J., Mullany L.C., Chu H.Y., LeClerq S.C., Kozuki N., Tielsch J.M. Impact of timing of influenza vaccination in pregnancy on transplacental antibody transfer, influenza incidence, and birth outcomes: a randomized trial in rural. *Nepal. Clin. Infect. Dis.*, 2018, Vol. 67, pp. 334–340.
10. Madhi S.A., Nunes M.C., Cutland C.L. Influenza vaccination of pregnant women and protection of their infants. *N. Engl. J. Med.*, 2014, Vol. 371, no. 24, p. 2340.
11. Marchenko V.Y., Susloparov I.M., Komissarov A.B., Fadeev A., Goncharova N.I., Shipovalov A.V., Svyatchenko S.V., Durymanov A.G., Ilyicheva T.N., Salchak L.K., Svintitskaya E.P., Mikheev V.N., Ryzhikov A.B.

Reintroduction of highly pathogenic avian influenza A/H5N8 virus of clade 2.3.4.4. in Russia. *Arch. Virol.*, 2017, Vol. 162, no. 5, pp. 1381-1385.

12. McVernon J., Laurie K., Faddy H., Irving D., Nolan T., Barr I., Kelso A. Seroprevalence of antibody to influenza A(H1N1)pdm09 attributed to vaccination or infection, before and after the second (2010) pandemic wave in Australia. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2014, Vol. 8, no. 2, pp. 194-200.

13. Meiklejohn G., Kempe C.H., Thalman W.G., Lennette E.H. Evaluation of monovalent influenza vaccines. II. Observations during an influenza A-prime epidemic. *Am. J. Hyg.*, 1952, Vol. 55, no. 1, pp. 12-21.

14. Mertz D., Geraci J., Winkup J., Gessner B.D., Ortiz J.R., Loeb M. Pregnancy as a risk factor for severe outcomes from influenza virus infection: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Vaccine*, 2017, Vol. 35, no. 4, pp. 521-528.

15. Nair H., Brooks W.A., Katz M., et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2011, Vol. 378, no. 9807, pp. 1917-1930.

16. Noah D.L., Hill H., Hines D., White E.L., Wolff M.C. Qualification of the hemagglutination inhibition assay in support of pandemic influenza vaccine licensure. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2009, Vol. 16, no. 4, pp. 558-566.

17. Palmeira P., Quinello C., Silveira-Lessa A.L., Zago C.A., Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, Vol. 2012, 985646. doi: 10.1155/2012/985646.

18. Sullivan S.G., Price O.H., Regan A.K. Burden, effectiveness and safety of influenza vaccines in elderly, paediatric and pregnant populations. *Ther. Adv. Vaccines Immunother.*, 2019, Vol. 7, 2515135519826481. doi: 10.1177/2515135519826481.

19. Weber M.A., Hartley J.C., Ashworth M.T., Malone M., Sebire N.J. Virological investigations in sudden unexpected deaths in infancy (SUDI). *Forensic Sci. Med. Pathol.*, 2010, Vol. 6, no. 4, pp. 261-267.

20. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019-2020 northern hemisphere influenza season. Available at: https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2019_20_north/en/.

21. World Health Organization. Seasonal vaccination policies and coverage in the European Region. Available at: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/241644/Evaluation-of-seasonal-influenza-vaccination-policies-and-coverage-in-the-WHO-European-Region.pdf.

22. Wu P., Goldstein E., Ho L.M., Wu J.T., Tsang T., Leung G.M., Cowling B.J. Excess mortality impact of two epidemics of pandemic influenza A(H1N1pdm09) virus in Hong Kong. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2014, Vol. 8, no. 1, pp. 1-7.

Авторы:

Ильичева Т.Н. — д.б.н., доцент, заведующая лабораторией ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Дурыманов А.Г. — старший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Иванова Е.В. — врач-вирусолог ФБУН «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» Роспотребнадзора, г. Новосибирск, Россия

Жирнов В.А. — к.б.н., заведующий лабораторией ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Authors:

Ilyicheva T.N., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head of Laboratory, Vector State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Durymanov A.G., Senior Research Associate, Vector State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Ivanova E.V., Virologist, Center for Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk Region, Novosibirsk, Russian Federation

Zhirnov V.A., PhD (Biology), Head of Laboratory, I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Епанчинцева А.В. — старший лаборант-исследователь
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Святченко С.В. — стажер-исследователь, аспирант
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Торжкова П.Ю. — старший лаборант-исследователь
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Буланович Ю.А. — старший лаборант-исследователь
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Рыжиков А.Б. — к.б.н., заведующий отделом ФБУН
«Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Epanchintseva A.V., Research Assistant, Vector State Research
Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk
Region, Russian Federation

Svyatchenko S.V., Research Intern, Postgraduate Student,
Vector State Research Center of Virology and Biotechnology,
Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Torzhkova P. Yu., Research Assistant, Vector State Research
Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk
Region, Russian Federation

Bulanovich Yu.A., Research Assistant, Vector State Research
Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk
Region, Russian Federation

Ryzhikov A.B., PhD (Biology), Head of Department, Vector
State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo,
Novosibirsk Region, Russian Federation

Поступила 06.07.2019

Отправлена на доработку 19.06.2019

Принята к печати 27.09.2019

Received 06.07.2019

Revision received 19.06.2019

Accepted 27.09.2019

ОЦЕНКА ТЯЖЕСТИ ХРОНИЧЕСКОГО ПОЛИПОЗНОГО РИНОСИНУСИТА НА ОСНОВЕ ИЗМЕНЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ IL-1 β И IL-1ra В НОСОВЫХ СЕКРЕТАХ

Безрукова Е.В.¹, Воробейчиков Е.В.², Конусова В.Г.²,
Симбирцев А.С.³

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»,
Санкт-Петербург, Россия

² ООО «Полифарм», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА
России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В работе представлена оценка распределения концентраций цитокинов (CIL-1 β) и (CIL-1ra) в носовых секретах пациентов с различными формами хронического полипозного риносинусита. Контрольная группа (№ 1) состояла из практически здоровых пациентов, группа № 2 состояла из пациентов с диагнозом «хронический полипозный риносинусит без гнойного воспаления в околоносовых пазухах и бронхиальной астмы», группа № 3 — пациенты с диагнозом «хронический полипозно-гнойный риносинусит», группа № 4 — пациенты с диагнозом «хронический полипозный риносинусит в сочетании с бронхиальной астмой». Секрет из носа собирали при помощи стерильного поролонового тампона, вводимого в полость носа на 15-20 мин. Затем турунды помещали в пробирку и центрифугировали 15 мин со скоростью 1000 об/мин. Полученный носовой секрет замораживали до -18,0 °C для дальнейшего определения концентраций цитокинов. Во всех группах пациентов концентрации цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Установлено, что при различных формах хронического полипозного процесса локальная продукция концентраций этих цитокинов статистически достоверно отличается от группы практически здоровых людей ($p < 0,05$). Выявлено увеличение значений концентрации IL-1 β в группе больных с ХПРС (№ 2) в 5 раз, в группе больных с ХПРС (№ 3) — в 15,5 раза, в группе больных с ХПРС + БА (№ 4) — в 13 раз по сравнению с практически здоровыми людьми. Концентрация IL-1ra в группе практически здоровых людей (№ 1) составляет 1825,64±463,70 пг/мл. При развитии ХПРС (группа № 2) происходит увеличение его значений до 3646,21±263,39 пг/мл. При развитии ХПРС (группа № 3) отмечается увеличение его значений до 2305,33±282,86 пг/мл, а при ХПРС + БА наблюдается снижение его значений до 956,15±213,02 пг/мл.

Однако разнонаправленный характер изменений концентраций этих цитокинов не позволяет их использовать в качестве индикатора тяжести течения полипозного процесса. Оценка концентраций цитокинов в виде соотношения CIL-1ra/CIL-1 β в носовых секретах пациентов групп № 1, № 2, № 3

Адрес для переписки:

Безрукова Евгения Валерьевна
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный
медицинский университет имени И.И. Мечникова»
195067, Россия, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47.
Тел.: 8 (921) 759-07-88.
E-mail: ban_@mail.ru

Address for correspondence:

Bezrukova Eugenia V.
North-Western State I. Mechnikov Medical University
690002, Russian Federation, St. Petersburg,
Piskarevsky ave., 47.
Phone: 7 (921) 759-07-88.
E-mail: ban_@mail.ru

Образец цитирования:

Е.В. Безрукова, Е.В. Воробейчиков, В.Г. Конусова,
А.С. Симбирцев «Оценка тяжести хронического
полипозного риносинусита на основе изменений
концентрации цитокинов IL-1 β и IL-1ra в носовых
секретах» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21,
№ 6. С. 1155-1162.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1155-1162

© Безрукова Е.В. и соавт., 2019

For citation:

E.V. Bezrukova, E.V. Vorobeychikov, V.G. Konusova,
A.S. Simbirtsev "Severity evaluation of chronic polypous
rhinosinusitis based on changes of IL-1 β cytokine and IL-1ra
concentrations in nasal secretions", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6,
pp. 1155-1162.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1155-1162

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1155-1162

и № 4 на основе проекции двухмерного пространственного распределения значений $C_2IL-1\alpha$ и $C_1IL-1\beta$ позволяет дифференцировать исследуемые группы пациентов. Соотношения $CIL-1\alpha/CIL-1\beta$ в носовых секретах пациентов изучаемых групп снижаются при увеличении тяжести хронического полипозного процесса и статистически достоверны ($p < 0,001$), что позволяет использовать этот показатель в качестве индикатора тяжести течения патологического процесса. Полученные 95% доверительные интервалы значений соотношений цитокинов демонстрируют целесообразность их использования в виде показателя эффективности иммунокорректирующих средств лечения.

Ключевые слова: хронический полипозный риносинусит, $IL-1\beta$, $IL-1\alpha$, цитокины, хронический риносинусит, интерлейкины

SEVERITY EVALUATION OF CHRONIC POLYPOUS RHINOSINUSITIS BASED ON CHANGES OF $IL-1\beta$ CYTOKINE AND $IL-1\alpha$ CONCENTRATIONS IN NASAL SECRETIONS

Bezrukova E.V.^a, Vorobeychikov E.V.^b, Konusova V.G.^b,
Simbirtsev A.S.^c

^a North-Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b Polifarm LLC, St. Petersburg, Russian Federation

^c State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. We provide the data on distribution of $IL-1\beta$ and $IL-1\alpha$ cytokine concentrations in nasal secretions from the patients with different forms of chronic polypous rhinosinusitis. The control group (group 1) included healthy persons. The second group consisted of patients exhibiting chronic polypous rhinosinusitis (CRS-NP), free of clinical signs of purulent inflammation in paranasal sinuses and/or bronchial asthma. The patients of group 3 were diagnosed with chronic purulent polypous rhinosinusitis (CPRS-NP). Group 4 consisted of the patients with chronic polypoid rhinosinusitis complicated by bronchial asthma (CRS-NP + BA). Cytokine concentration was determined by means of ELISA tests for all the patient groups. We have found that the local concentrations of $IL-1\alpha$ and $IL-1\beta$ cytokines were significantly different ($p < 0.05$) from the group of healthy individuals, dependent on the clinical forms of chronic polyposis. $IL-1\beta$ concentrations in the group of patients with CRS-NP (No. 2) were increased 5-fold, for group of CPRS-NP patients (No. 3), these levels showed a 15.5-fold increase. In the group of patients with CRS-NP + BA (No. 4), the $IL-1$ levels were 13-fold higher in comparison with healthy controls. The $IL-1\alpha$ concentration in the group of healthy people (No. 1) was 1825.64 ± 463.70 pg/ml. Upon development of CRS-NP (No. 2), an increase in its values up to 3646.21 ± 263.39 pg/ml was registered. Upon development of CPRS-NP (No. 3), an increase in appropriate values up to 2305.33 ± 282.86 pg/ml was noted, and, in cases of CRS-NP + BA, a decrease in its values to 956.15 ± 213.02 pg/ml was observed.

Meanwhile, a conflicting character was revealed for the changes in these cytokines, thus preventing their usage as an indicator of polyposis severity. At the same time, estimation of the $CIL-1\alpha/CIL-1\beta$ ratio in nasal secretions of the patients in groups 1, 2, 3 and 4 based on two-dimensional projection of the spatial $CIL-1\alpha/CIL-1\beta$ distribution provides a basis for discrimination of the patient groups. The $CIL-1\alpha/CIL-1\beta$ ratio as assessed for nasal secretions of patients belonging to groups 1, 2, 3, and 4 shows a general, statistically significant decrease with increasing severity of chronic polyposis ($p < 0.001$), thus making this parameter indifformative for intensity of the pathological process. The resulting 95% confidence intervals confirm that the cytokine ratios are promising parameter in order to estimate the efficiency of immune therapy.

Keywords: chronic rhinosinusitis, nasal polyposis, $IL-1\beta$, $IL-1\alpha$, cytokines, chronic rhinosinusitis, interleukins

Введение

В структуре ЛОР-заболеваемости хронический полипозный риносинусит (ХПРС) занимает около 30% [8, 9] и рассматривается как хронический воспалительный процесс, сопровождающийся полипообразным разрастанием слизистой оболочки околоносовых пазух. Ведущим звеном патогенеза является дисфункция слизистой верхних дыхательных путей (ВДП), основу которой составляет измененный полиморфизм генов, кодирующих рецепторы и медиаторы местной воспалительной реакции, а также разнонаправленная экспрессия цитокинов и хемокинов [3, 5]. При развитии ХПРС отмечается измененная экспрессия цитокинов: IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-1 β , TNF α [5, 6, 7, 8]. Различная направленность изменений концентраций указанных цитокинов в носовых секретах пациентов детализирует отдельные патогенетические механизмы заболевания, например состояние мукозального иммунитета. Однако не позволяет определить тяжесть течения воспалительного процесса и интерпретировать изменения этого показателя под влиянием иммунокорректирующего лечения.

Решение этой задачи может базироваться на оценке концентраций противовоспалительного цитокина IL-1ra и провоспалительного цитокина IL-1 β . Эта пара цитокинов функционально связана между собой, так как при развитии воспалительного процесса рецепторный антагонист IL-1ra нейтрализует избыточное количество цитокина IL-1 β , действующего на ткани. Поэтому оценка одномерного и двухмерного распределения параметров этих цитокинов относительно различных форм ХПРС является актуальной информацией для решения диагностических и терапевтических задач.

Целью исследования является определение распределения концентраций цитокинов IL-1 β и IL-1ra в носовых секретах пациентов с различными формами хронического полипозного процесса для оценки тяжести его течения.

Материалы и методы

Пациенты с ХПРС в возрасте от 30 до 60 лет были ранжированы на четыре группы. Контрольная группа № 1 включала 38 практически здоровых людей. Группа № 2 состояла из 46 человек с диагнозом ХПРС, у которых на момент исследования не было выявлено бронхиальной астмы и гнойного отделяемого в околоносовых пазухах. Группа № 3 — из 39 человек с диагнозом «хронический полипозно-гнойный риносинусит» (ХПГРС). Группа № 4 — из 71 человек с диагно-

зом «ХПРС в сочетании с бронхиальной астмой» (ХПРС + БА).

Секрет из носа собирали при помощи стерильного поролонового тампона, вводимого в полость носа на 15–20 мин. Затем турунды помещали в пробирку и центрифугировали 15 мин со скоростью 1000 об/мин. Полученный носовой секрет замораживали до -18,0 °С для дальнейшего определения концентраций цитокинов. Во всех группах пациентов определение концентрации цитокинов проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением тест-систем производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург).

Для оценки результатов исследования применяли методы описательной, параметрической и непараметрической статистики [1, 2, 4]. Для определения достоверности различий значений концентраций цитокинов использовали критерий Стьюдента, дисперсионный анализ для независимых выборок, непараметрический критерий Краскела–Уоллиса для независимых выборок. Вероятность $p < 0,05$ оценивали как достаточную для вывода о наличии статистически достоверных различий данных, полученных в процессе исследования.

Результаты и обсуждение

В таблице 1 по диагонали представлены концентрации цитокина IL-1 β (C_1 IL-1 β) в носовых секретах пациентов всех групп (№ 1–4). По сравнению с группой практически здоровых пациентов (№ 1), в группе больных с ХПРС (№ 2) отмечается увеличение значений концентрации этого цитокина в 5,0 раз, в группе больных с ХПГРС (№ 3) — в 15,5 раза, в группе больных с ХПРС + БА (№ 4) — в 13,0 раз. Вероятно, что повышение экспрессии значений C_1 IL-1 β отражает развитие пролиферативного процесса, связанного с ростом полипов и периодом длительного воспаления. Однако немонокотонное увеличение этого показателя не позволяет его использовать в качестве индикатора тяжести заболевания.

Статистическая достоверность различий средних значений C_1 IL-1 β в группах пациентов № 2, 3 и 4 относительно контрольной группы № 1, а также между группами № 2–3, № 2–4 достаточна высокая и значима ($p < 0,001$). Это позволяет по средним значениям показателя C_1 IL-1 β дифференцировать практически здоровых людей от пациентов с ХПРС, ХПГРС и ХПРС + БА. Однако достоверных различий средних концентраций C_1 IL-1 β между группами больных ХПГРС (№ 3) и ХПРС + БА (№ 4) не обнаружено ($p > 0,05$), что не обеспечивает классифика-

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ СРЕДНИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ IL-1 β (M $\pm$ SD, пг/мл) В НОСОВОМ СЕКРЕТЕ ПАЦИЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП И ИХ СТАТИСТИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ (t, p)

TABLE 1. COMPARATIVE VALUES OF AVERAGE CONCENTRATIONS IL-1 β (M $\pm$ SD, pg/ml) IN NASAL SECRETS IN PATIENTS OF DIFFERENT GROUP AND STATISTICAL DIFFERENCES (t, p)

Группы пациентов, № Groups of patients, No.	1	2	3	4
1	21,04 $\pm$ 2,96	t = -20,99; p < 0,001	t = -21,38; p < 0,001	t = -14,02; p < 0,001
2	—	108,60 $\pm$ 16,77	t = -14,81; p < 0,001	t = -9,05; p < 0,001
3	—	—	326,05 $\pm$ 48,91	t = 2,05; p > 0,05
4	—	—	—	272,32 $\pm$ 57,70

Примечание. Средние значения со стандартными отклонениями (M $\pm$ SD) представлены по диагонали; различия между группами в остальных клетках: t – значения критерия Стьюдента, p – уровень значимости.

Note. Mean values with standard deviations (M $\pm$ SD) are represented by diagonal; differences between the groups in the remaining cells: t, t-test value of p, significance level.

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ СРЕДНИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ IL-1ra (M $\pm$ SD, пг/мл) В НОСОВОМ СЕКРЕТЕ ПАЦИЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП И ИХ СТАТИСТИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ (t, p)

TABLE 2. COMPARATIVE VALUES OF AVERAGE CONCENTRATIONS IL-1ra (M $\pm$ SD, pg/ml) IN NASAL SECRETS IN PATIENTS OF DIFFERENT GROUP AND STATISTICAL DIFFERENCES (t, p)

Группы пациентов, № Groups of patients, No.	1	2	3	4
1	1910,37 $\pm$ 361,21	t = -12,68; p < 0,001	t = -3,24; p < 0,01	t = 6,22; p < 0,001
2	—	3644,93 $\pm$ 237,85	t = 13,82; p < 0,001	t = 31,91; p < 0,001
3	—	—	2347,05 $\pm$ 188,86	t = 14,76; p < 0,001
4	—	—	—	971,49 $\pm$ 270,06

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

цию указанных форм хронического полипозного процесса по этому показателю. Возможно, что неустановленные достоверные различия концентрации цитокина IL-1 β в группах пациентов № 3 и № 4 связаны с отсутствием специфичности изменений этого цитокина, который не зависит от этиологии или осложнений воспалительного процесса.

В таблице 2 по диагонали представлены значения концентрации цитокина IL-1ra (C₂IL-1ra)

в носовых секретах пациентов всех исследуемых групп (№ 1-4). При развитии ХПРС (группа № 2) и ХПГРС (группа № 3) происходит увеличение его значений, а при ХПРС + БА (группа № 4), наоборот, наблюдается его снижение. Это означает, что при указанных клинических формах полипозного процесса средние значения концентраций противовоспалительного цитокина C₂IL-1ra в носовом секрете пациентов также имеют различную направленность изменений, что указы-

ТАБЛИЦА 3. РАЗЛИЧИЯ СРЕДНИХ ЗНАЧЕНИЙ СООТНОШЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИЙ C₂IL-1ra/C₁IL-1β В НОСОВОМ СЕКРЕТЕ ПАЦИЕНТОВ МЕЖДУ ГРУППАМИ № 1, № 2, № 3, № 4

TABLE 3. DIFFERENCES OF MEAN VALUES CONCENTRATION RATIOS C₂IL-1ra/C₁IL-1β NASAL SECRETION IN PATIENTS BETWEEN GROUPS No. 1, No. 2, No. 3, No. 4

Группы пациентов, № Groups of patients, No.	Значение соотношений Value ratios C ₂ IL-1ra/C ₁ IL-1β	Дисперсия Dispersion D	Значение F-критерия (Фишера) Significance F test (Fisher)	Критическое значение F-критерия Critical value of F test	Уровень значимости, p Significance level, p	Критерий χ ² (хи-квадрат) Уровень значимости, p Criterion χ ² Significance level, p
2 3	34,48 7,39	43,75 2,11	241,31	4,17	< 0,001	62,58 < 0,001
2 4	34,48 3,71	43,75 1,61	312,55	4,17	< 0,001	83,04 < 0,001
3 4	7,39 3,71	2,11 1,61	32,73	4,19	< 0,001	65,32 < 0,001
2 1	34,48 92,29	43,75 414,02	76,78	4,19	< 0,001	61,71 < 0,001
3 1	7,39 92,29	2,11 414,02	161,01	4,22	< 0,001	57,01 < 0,001
4 1	3,71 92,29	1,61 414,02	174,95	4,22	< 0,001	63,48 < 0,001

Примечание. Средние и медианные значения соотношения C₂IL-1ra/C₁IL-1β практически равны между собой.

Note. Mean and median ratio C₂IL-1ra/C₁IL-1β substantially equal.

вает на отсутствие его монотонного повышения или снижения и, соответственно, демонстрирует невозможность его применения в качестве индикатора тяжести развития заболевания.

Различия средних концентраций этого цитокина между группами пациентов показывают их высокую статистическую достоверность ($p < 0,001$), что позволяет по уровню средних значений C₂IL-1ra дифференцировать практически здоровых пациентов от групп пациентов с указанными формами полипозного процесса, а также дифференцировать, с определенными допущениями, пациентов между группами: № 2-3, № 2-4 и № 3-4. Вместе с тем такая дифференцировка требует дополнительной детализации. Например, целесообразна оценка нелинейных изменений значений показателя C₂IL-1ra в указанных группах пациентов с определением устойчивости или неустойчивости этого показателя в виде фазового портрета, то есть исследования его динамического поведения с характеристикой особых критических точек (узел, фокус, седло, центр) [8, 9], учитывающих различную тяжесть патологического процесса. Такой подход имеет фундаментальное значение, но его реализация потребует применения «теории катастроф» Рене

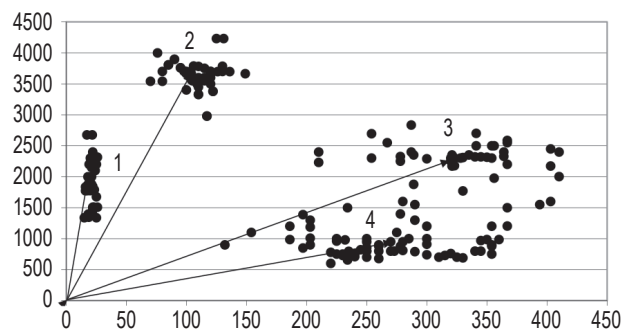


Рисунок 1. Двухмерное распределение концентраций цитокинов C₂IL-1ra (ось ординат) и C₁IL-1β (ось абсцисс) и их значений в виде отношения C₂IL-1ra/C₁IL-1β при различных клинических формах хронического полипозного процесса

Примечание. Исследуемые группы: 1, 2, 3, 4.

Figure 1. Two-dimensional concentration distribution cytokines C₂IL-1ra (ordinate axis) and C₁IL-1β (abscissa) and their values as a ratio C₂IL-1ra/C₁IL-1β in different clinical forms of chronic polypoid process

Note. Test groups: 1, 2, 3, 4.

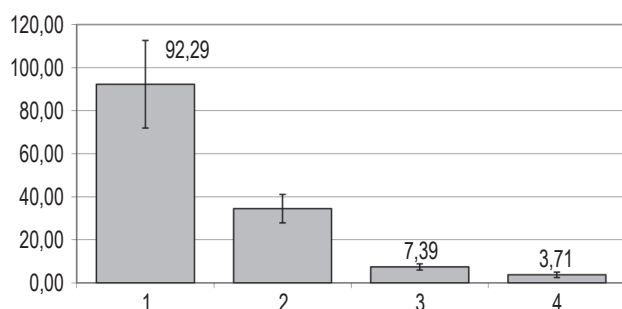


Рисунок 2. Соотношение концентраций ($C_2IL-1ra/C_1IL-1\beta$) в носовом секрете пациентов в группах 1, 2, 3 и 4

Примечание. Ось абсцисс: группы пациентов. Ось ординат: значение соотношений концентраций $C_2IL-1ra/C_1IL-1\beta$, пг/мл.

Figure 2. Concentration ratio ($C_2IL-1ra/C_1IL-1\beta$) in the nasal secretions of patients in group 1, 2, 3 and 4

Note. The abscissa: patients. y-axis: ratio value $C_2IL-1ra/C_1IL-1\beta$ concentration, pg/ml.

Тома [10], которая на данном этапе исследования не рассматривается.

На рисунке 1 представлено двухмерное распределение значений $C_2IL-1ra$ и $C_1IL-1\beta$ в группах пациентов № 1, № 2, № 3 и № 4. Отчетливо видно, что в пространстве двух значений показателей $C_2IL-1ra$ и $C_1IL-1\beta$ разделяются практически все группы пациентов. Расстояние между центрами групп № 1 и № 2, а также в случае объединенной группы № 3 и № 4 достаточно велико, что позволяет с определенными допущениями дифференцировать их между собой. Однако по показателю $C_1IL-1\beta$ разброс значений между группами № 3 и № 4 показывает близкое расположение этих групп, что затрудняет их надежное разделение.

Более точная классификация исследуемых групп может быть получена за счет введения отношения двух значений показателей ($C_2IL-1ra/C_1IL-1\beta$) в виде графиков из 4 линий, соединяющих 0 с центрами групп пациентов № 1, № 2, № 3 и № 4. Этот вариант классификации показывает, что прогрессирование тяжести хронического полипозного процесса коррелирует со снижением значений дроби или отношения показателей ($C_2IL-1ra/C_1IL-1\beta$) в исследуемых группах. Поэтому, несмотря на то, что каждый из показателей нелинейно меняется в зависимости от тяжести патологии, их отношение может рассматриваться как индикатор тяжести патологического процесса.

Визуальная оценка изменений отношения концентраций ($C_2IL-1ra/C_1IL-1\beta$) в носовом секрете пациентов указанных групп представлена на рисунке 2. В группе № 1 отмечается максимальное соотношение между концентрациями указанных цитокинов, что демонстрирует отсутствие баланса между $C_2IL-1ra$ и $C_1IL-1\beta$, и в условиях относительной нормы соотношение их концентраций находится в виде $C_2 \gg C_1$. Это означает, что при отсутствии патологических воспалительных процессов концентрация $IL-1ra$ превышает концентрации $IL-1\beta$ в 90-100 раз, обеспечивая буферную защиту слизистой оболочки от повышения концентрации $IL-1\beta$, индуцируемого периодическим развитием воспалительной реакции.

При развитии хронического полипозного процесса наблюдается снижение соотношения концентраций между цитокинами во всех группах. Более выраженное снижение соотношения концентраций $C_2IL-1ra/C_1IL-1\beta$ отмечается при присоединении гнойного воспалительного процесса и наличии бронхиальной астмы. Возможно, что в этих случаях буферная защитная концентрации $IL-1ra$ снижается на фоне увеличенного количества $IL-1\beta$ и приводит к практическому выравниванию концентраций этих цитокинов. Такое

ТАБЛИЦА 4. ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ 95% ИНТЕРВАЛЫ СООТНОШЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЦИТОКИНОВ $C_2IL-1ra/C_1IL-1\beta$ В НОСОВОМ СЕКРЕТЕ ПАЦИЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП ($\alpha = 0,05$)

TABLE 4. 95% CONFIDENCE INTERVALS CYTOKINE CONCENTRATION RATIOS $C_2IL-1ra/C_1IL-1\beta$ NASAL SECRETION IN THE DIFFERENT GROUPS OF PATIENTS ($\alpha = 0,05$)

Группы пациентов, № Groups of patients, No.	Среднее значение, М Average value, M $C_2IL-1ra/C_1IL-1\beta$	Стандартная ошибка, $\pm m$ Standard error $\pm m$	Значение Т-критерия (критическое) Value of T test (critical)	Доверительный интервал (95%) Confidence interval (95%)
1	92,29	3,30	2,02	85,62-98,95
2	34,48	0,97	2,01	32,53-36,43
3	7,39	0,23	2,02	6,92-7,85
4	3,71	0,15	1,99	3,41-4,01

соотношение является неблагоприятным прогностическим признаком, указывающим на нарушение мукозального иммунитета и прогрессирование воспалительного процесса в слизистой оболочке носа и околоносовых пазух.

В таблице 3 приведены результаты статистической достоверности различий значений соотношений концентраций (IL-1ra/IL-1β) между группами пациентов на основе дисперсионного анализа и непараметрического критерия Краскала–Уоллиса. В таблице 4 представлены 95% доверительные интервалы средних значений соотношений концентраций цитокинов (C_2 IL-1ra/ C_1 IL-1β) в носовом секрете пациентов в группах № 1, № 2, № 3 и № 4, позволяющих оценить вероятность интервальных значений соотношений цитокинов для решения диагностических и терапевтических задач.

Результаты расчетов показывают, что различия средних и медианных значений соотношений цитокинов (C_2 IL-1ra/ C_1 IL-1β) в носовом секрете пациентов между группами № 1, № 2, № 3 и № 4 имеют статистическую достоверность ($p < 0,001$). Это позволяет использовать полученные значения в качестве индикатора тяжести течения хронического полипозного процесса. С вероятностью (P) 95% можно утверждать, что полученные интервальные значения соотношений цитоки-

нов в указанных группах пациентов также подтверждают возможность их применения в качестве индикатора тяжести течения хронического полипозного процесса, который целесообразно использовать в виде показателя эффективности иммунокорректирующих средств лечения.

Выводы

1. При различных формах хронического полипозного процесса локальная продукция цитокинов IL-1ra и IL-1β достоверно отличается от группы практически здоровых людей. Однако разнонаправленный характер изменений концентраций этих цитокинов не позволяет их использовать в качестве индикатора тяжести течения полипозного процесса.

2. Оценка соотношений значений цитокинов в виде C_2 IL-1ra/ C_1 IL-1β в носовых секретах пациентов групп № 1, № 2, № 3 и № 4 на основе проекции двухмерного пространственного распределения значений C_2 IL-1ra и C_1 IL-1β позволяет дифференцировать исследуемые группы пациентов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность профессору Борису Бершадскому (США) за полезные замечания и обсуждение данного исследования.

Список литературы / References

1. Мятлев В.Д., Панченко Л.А., Ризниченко Г.Ю., Терехин А.Т. Теория вероятностей и математическая статистика. Математические модели: учебник для академического бакалавриата / 2-е изд., испр. и доп. М.: Юрайт, 2018. 321 с. [Myatlev.V.D., Panchenko L.A., Riznichenko G.Yu., Terekhin A.T. Teoriya veroyatnostey i matematicheskaya statistika matematicheskie modeli: Uchebnik dlya akademicheskogo bakalavriata / 2 e izd. ispr. Dop]. Moscow: Yurait, 2018. 321 p.
2. Ризниченко Г.Ю. Лекции по математическим моделям в биологии. Часть 1. Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2002. 232 с. [Riznichenko G.Yu. Lekcii po matematicheskim modelyam v biologii. Chast 1]. Izhevsk: NIC "Regulyarnaya i haoticheskaya dinamika", 2002. 232 p.
3. Стагниева И.В., Бойко Н.В., Гукасян Е.Л., Бачурина А.С. Значение определения цитокинового профиля при назначении персонализированного лечения заболеваний верхних дыхательных путей // Российская оториноларингология, 2017. № 3. С. 110-118. [Stagnieva I.V., Boiko N.V., Gukasyan E.L., Bachurina A.S. Significance of determination of cytokine profile in the appointment of the personalized treatment of the upper respiratory tract diseases. Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology, 2017, no. 3, pp. 110-118. (In Russ.)]
4. Субботина А.В., Гржибовский А.М. Описательная статистика и проверка нормальности распределения количественных данных // Экология человека, 2014. № 2. С. 51-57. [Subbotina A.V., Grjibovski A.M. Descriptive statistics and normality testing for quantitative data. Ekologiya cheloveka = Human Ecology, 2014, no. 2, pp. 51-57. (In Russ.)]
5. Kim D.K., Eun K.M., Kim M.K., Cho D., Han S.A., Han S.Y., Seo Y., Lee D.H., Cho S.H., Kim D.W. Comparison Between signature cytokines of nasal tissues in subtypes of chronic rhinosinusitis. Allergy Asthma Immunol. Res., 2019, Vol. 11, no. 2, pp. 201-211.
6. Ickrath P., Scherzad A., Kleinsasser N., Ginzkey C., Hagen R., Hackenberg S. Influence of nasal polyp tissue on the differentiation and activation of T lymphocytes in a co-culture system. Biomed. Rep., 2019, Vol. 10, no. 2, pp. 119-126.
7. Plewka D., Grzanka A., Drzewiecka E., Plewka A., Misiólek M., Lisowska G., Rostkowska-Nadolska B., Gawlik R. Differential expression of tumor necrosis factor α, interleukin 1β, nuclear factor κB in nasal mucosa

among chronic rhinosinusitis patients with and without polyps. *Postepy Dermatol. Alergol.*, 2017, Vol. 34, no. 3, pp. 199-206.

8. Stevens W.W., Schleimer R.P., Kern R.C. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2016, Vol. 4, no. 4, pp. 565-572.

9. van Bruaene N., Bachert C. Tissue remodeling in chronic rhinosinusitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 1, pp. 8-11.

Авторы:

Безрукова Е.В. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Воробейчиков Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник ООО «Полифарм», Санкт-Петербург, Россия

Конусова В.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник ООО «Полифарм», Санкт-Петербург, Россия

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, научный руководитель ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Bezrukova E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorinolaryngology, North-Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Vorobeychikov E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Polifarm LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Konusova V.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Polifarm LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director for Research, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 22.03.2019

Отправлена на доработку 05.04.2019

Принята к печати 09.04.2019

Received 22.03.2019

Revision received 05.04.2019

Accepted 09.04.2019

ДИАГНОСТИКА И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ ПО УРОВНЮ МЕСТНЫХ ЦИТОКИНОВ

Агарков Н.М.¹, Чухраёв А.М.², Яблокова Н.В.³

¹ ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

² ФГАУ «НМИЦ «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ Тамбовский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Резюме. Заболеваемость населения глаукомой имеет высокую распространенность в различных странах мира и является ведущей причиной потери зрения населения, что указывает на актуальность поиска новых и информативных методов диагностики данного заболевания, в патогенезе которого, согласно современным представлениям, важное значение принадлежит изменению локальных интерлейкинов.

Цель исследования — совершенствование диагностики и прогнозирование первичной открытоугольной глаукомы на основе информативности интерлейкинов на локальном уровне.

Исследование проводилось на базе «МНТК „Микрохирургия глаза“ им. академика С.Н. Федорова». Основная группа больных представлена в количестве 109 пациентов с первичной открытоугольной глаукомой II стадии. Возраст пациентов с глаукомой варьировал от 58 до 75 лет с медианой $62,4 \pm 2,5$ лет. Контрольная группа состояла из 52 человек без глаукомы в настоящее время и в анамнезе, средний возраст которых достоверно не отличался от представителей основной группы — $59,6 \pm 2,8$ лет ($p > 0,05$).

Изучение содержания интерлейкинов в слезной жидкости проводилось на иммуноферментном анализаторе Multiscan (Финляндия) посредством метода сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа с применением тест-систем R&D Diagnostic Inc. (США). Диагностическая значимость (информативность) локальных интерлейкинов рассчитывалась по общепринятой формуле.

У пациентов с первичной открытоугольной глаукомой выявлены статистически значимые изменения в уровне интерлейкинов слезной жидкости. При этом наибольшее повышение содержания локальных интерлейкинов характерно для IL-2 и IL-17 — в 8,4 и 8,3 раза соответственно. В слезной жидкости больных первичной открытоугольной глаукомой существенно возросло также содержание IL-8. Однако изменение изученных локальных противовоспалительных интерлейкинов носило разнонаправленный характер — уровень IL-4 при сформировавшейся первичной открытоугольной глаукоме достоверно повысился, а уровень IL-10, напротив, репрезентативно снизился. Оценка диагностической значимости по величине информативности локальных интерлейкинов свидетельствует о максимальной информативности IL-2 ($J = 637,4$) и IL-17 ($J = 612,8$), что указывает на ведущее их значение в диагностике первичной открытоугольной глаукомы. Высокий уровень информативности характерен для IL-8 ($J = 572,5$). По наиболее информативным интерлейкинам в слезной жидкости с

Адрес для переписки:

Агарков Николай Михайлович
ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет»
305040, Россия, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.
Тел.: 8 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Address for correspondence:

Agarkov Nikolay M.
Southwest State University
305040, Russian Federation, Kursk,
50 let Oktyabrya str., 94.
Phone: 7 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Образец цитирования:

Н.М. Агарков, А.М. Чухраёв, Н.В. Яблокова
«Диагностика и прогнозирование первичной открытоугольной глаукомы по уровню местных цитокинов» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1163-1168.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1163-1168

© Агарков Н.М. и соавт., 2019

For citation:

N.M. Agarkov, A.M. Chukhraev, N.V. Yablokova "Diagnosis and prediction of primary open-angle glaucoma by the level of local cytokine", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1163-1168.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1163-1168

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1163-1168

помощью регрессионного анализа разработана математическая модель, обеспечивающая с высокой вероятностью ($P < 0,001$) прогнозирование первичной открытоугольной глаукомы.

Ведущими информативными интерлейкинами слезной жидкости для диагностики и прогнозирования первичной открытоугольной глаукомы являются IL-2, IL-7 и IL-8.

Ключевые слова: глаукома, интерлейкины, лабораторная диагностика, прогнозирование, заболеваемость

DIAGNOSIS AND PREDICTION OF PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA BY THE LEVEL OF LOCAL CYTOKINES

Agarkov N.M.^a, Chukhraev A.M.^b, Yablokova N.V.^c

^a Southwest State University, Kursk, Russian Federation

^b S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex "Eye Microsurgery", Moscow, Russian Federation

^c Tambov Branch, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex "Eye Microsurgery", Tambov, Russian Federation

Abstract. The incidence of glaucoma is rather high in different countries, being the leading cause of visual loss in the population, thus presuming relevance of the search for new and informative methods of diagnosing this disease. According to modern views, changes of local interleukins seem to be important for the glaucoma pathogenesis. The aim of present study was to improve diagnosis and prognosis of primary open-angle glaucoma on the basis of information content of interleukins at the local level. The study was conducted on the basis of S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex "Eye Microsurgery". The main group of patients consisted of 109 patients with primary open-angle stage II glaucoma. The age of glaucoma patients ranged from 58 to 75 years with a median of 62.4 ± 2.5 years. The control group consisted of 52 persons without glaucoma at present and in past, the average age of which did not differ significantly from the members of the main group, i.e., 59.6 ± 2.8 years ($p > 0.05$). The studies of interleukin content in lacrimal fluid was carried out by means of the Multiscan enzyme immunoassay (Finland) using common sandwich-variant of solid-phase enzyme immunoassay with R&D Diagnostic Inc. test systems (USA). The diagnostic significance (informativeness) for local interleukins was calculated according to the generally accepted formula. Statistically significant changes in the levels of lacrimal interleukins were revealed in the patients with primary open-angle glaucoma. The highest increase in the content of local interleukins was found for IL-2 (8.4-fold) and IL-17 (8.3-fold). The content of IL-8 was also increased significantly in the lacrimal fluid of patients with primary open-angle glaucoma. However, the changes in the studied local anti-inflammatory interleukins proved to be multidirectional: the level of IL-4 in the formed primary open-angle glaucoma was significantly increased, and the level of IL-10, on the contrary, was decreased. Evaluation of diagnostic significance by the local interleukin levels showed the maximal informative value for IL-2 ($J = 637.4$), and IL-17 ($J = 612.8$), which indicates their leading role for diagnostics of primary open-angle glaucoma. High level of information content is typical for IL-8 ($J = 572.5$). Using regression analysis for the most informative interleukins in lacrimal fluid, we have developed a mathematical model that provides a high-probability prediction ($P < 0.001$) of primary open-angle glaucoma. Lacrimal concentrations of IL-2, IL-7 and IL-8 are the most informative indexes of lacrimal fluid for the diagnosis and prediction of primary open-angle glaucoma.

Keywords: glaucoma, interleukins, laboratory diagnostics, forecasting, morbidity

Введение

Неблагоприятные тенденции в заболеваемости населения глаукомой наблюдаются в различных странах. Так, в Дании за период с 1996 по 2011 г. количество заболевших глаукомой возросло с 7200 до 8600 ежегодно новых пациентов [9]. Самое большое количество больных с этой патологией насчитывается в Китае — 21,82 миллиона человек [13], а удельный вес ее соответствует 2,14% среди сельского населения и 3,6% в Пекине среди взрослых старше 40 лет. По данным Сеульского национального университета [8], в Южной Корее заболеваемость глаукомой с 2005 по 2011 г. достоверно повысилась и достиг-

ла 1,98% в структуре болезней глаза среди жителей 40 лет и старше.

Согласно международным публикациям, к 2020 г. в мире прогнозируется число таких пациентов до 80 миллионов [12]. Высокая распространенность глаукомы во всех странах мира и ее ведущее место в структуре причин слепоты и слабо зрения побуждают исследователей на всех континентах выполнять новые эпидемиологические и диагностические исследования [1, 10, 11].

Осуществляемая в настоящее время диагностика глаукомы по параметрам внутриглазного давления не всегда является результативной. Поэтому продолжается научный поиск новых

диагностических маркеров глаукомы, позволяющих выявлять данную патологию и осуществлять прогнозирование ее на ранних стадиях развития. В единичных исследованиях последних лет показано, что при диагностике глаукомы следует учитывать содержание интерлейкинов в слезной жидкости. Однако диагностическая значимость и информативность местных (локальных) интерлейкинов при глаукоме остается неизученной. Кроме того, отсутствует научная информация о прогностичности интерлейкинов слезной жидкости у больных глаукомой, что указывает на актуальность выполнения научных исследований.

Цель исследования — совершенствование диагностики и прогнозирование первичной открытоугольной глаукомы на основе информативности интерлейкинов на локальном уровне.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова». Основная группа больных представлена в количестве 109 пациентов с первичной открытоугольной глаукомой II стадии. Возраст пациентов с глаукомой варьировал от 58 до 75 лет с медианой $62,4 \pm 2,5$ лет. Контрольная группа состояла из 52 человек без глаукомы в настоящее время и в анамнезе, средний возраст которых достоверно не отличался от представителей основной группы — $59,6 \pm 2,8$ лет ($p > 0,05$).

Изучение содержания интерлейкинов в слезной жидкости проводилось на иммуноферментном анализаторе Multiscan (Финляндия) посредством метода сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа с применением тест-систем R&D Diagnostic Inc. (США). Диагностическая значимость (информативность) локальных интерлейкинов рассчитывалась по формуле:

$$J = 10 \lg \frac{p_1}{p_2} \times 0,5 \times (p_1 - p_2),$$

где J — информативность показателя, p_1 — частота признака в контрольной группе, p_2 — частота этого же признака у больных первичной открытоугольной глаукомой.

Для оценки достоверности различий содержания интерлейкинов в слезной жидкости в сравниваемых группах использовались непараметрический критерий Т-Уайта и параметрический критерий t Стьюдента. Различие считалось репрезентативным при $p < 0,05$.

Исследование осуществлялось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice). Перед выполнением ис-

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ И В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ ($M \pm m$)

TABLE 1. INTERLEUKIN LEVELS IN LACRIMAL FLUID IN PATIENTS WITH PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA AND IN THE CONTROL GROUP ($M \pm m$)

Интерлейкины, единица измерения Interleukin, unit	Пациенты с первичной открытоугольной глаукомой Patients with primary open-angle glaucoma	Контрольная группа Control group	p
IL-1 β , пг/мл pg/ml	232,6 $\pm$ 4,3	69,5 $\pm$ 3,1	< 0,001
IL-4, пг/мл pg/ml	15,4 $\pm$ 0,8	3,3 $\pm$ 0,5	< 0,001
IL-2, пг/мл pg/ml	22,6 $\pm$ 0,9	2,7 $\pm$ 0,4	< 0,001
IL-8, пг/мл pg/ml	24,5 $\pm$ 1,0	3,6 $\pm$ 0,3	< 0,001
IL-6, пг/мл pg/ml	67,8 $\pm$ 3,1	20,4 $\pm$ 1,8	< 0,001
IL-7, пг/мл pg/ml	8,5 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 0,3	< 0,001
IL-17, пг/мл pg/ml	34,7 $\pm$ 2,1	4,2 $\pm$ 0,4	< 0,001
IL-18, пг/мл pg/ml	1289,6 $\pm$ 6,2	547,4 $\pm$ 6,4	< 0,001
IL-10, пг/мл pg/ml	6,3 $\pm$ 0,3	14,5 $\pm$ 0,4	< 0,001

следования у всех пациентов получено письменное информированное согласие.

Результаты

Развитие первичной открытоугольной глаукомы сопровождается существенными репрезентативными изменениями в содержании уровня интерлейкинов в слезной жидкости во всех случаях (табл. 1). Сформировавшаяся первичная открытоугольная глаукома характеризуется прежде всего высоким повышением на местном уровне концентрации IL-2 и IL-17, причем их увеличение практически одинаково и достигает, соответственно, 8,4 и 8,3 раза. В исследуемом биоматериале больных основной группы значительно возросло также содержание IL-8. В значительной степени повысился уровень противовоспалительного IL-4 в слезной жидкости пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. Однако содержание другого противовоспалительного цитокина (IL-10) существенно снизилось

**ТАБЛИЦА 2. ВЕЛИЧИНА ИНФОРМАТИВНОСТИ
ИНТЕРЛЕЙКИНОВ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ
ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ**

TABLE 2. VALUE OF INFORMATION CONTENT OF LACRIMAL
FLUID INTERLEUKINS IN PATIENTS WITH PRIMARY
OPEN-ANGLE GLAUCOMA

Название интерлейкина Name of interleukin	Величина информативности Value of information content	Ранговое место Rank place
IL-1 β	215,2	6
IL-4	245,7	4
IL-2	637,4	1
IL-8	572,5	3
IL-6	221,3	5
IL-7	186,7	8
IL-17	612,8	2
IL-18	204,9	7
IL-10	164,1	9

в слезной жидкости больных основной группы по сравнению с контрольной. Следовательно, изменение противовоспалительных цитокинов на местном уровне в связи с сформировавшейся первичной открытоугольной глаукомой имело противоположную динамику. Следует также обратить внимание на то, что указанное выше изменение уровня IL-10 в слезной жидкости у больных основной группы было наименьшим.

Более существенные и с противоположной направленностью по отношению к IL-10 у больных первичной открытоугольной глаукомой изменения наблюдались в содержании слезной жидкости IL-1 β , IL-6 и IL-7, выражающиеся в повышении в 3,0-3,4 раза.

При анализе информативности показателей местного интерлейкинового профиля у больных со сформировавшейся первичной открытоугольной глаукомой установлены наивысшие значения для IL-2 и IL-17, что указывает на ведущее их диагностическое значение, хотя величина информативности IL-2 является максимальной и существенно большей, чем у IL-17 (табл. 2). На третьей ранговой позиции по диагностической значимости среди изученных интерлейкинов слезной жидкости при рассматриваемой патологии находится IL-8, информативность которого очень высокая.

Информативность других проанализированных интерлейкинов на локальном уровне у больных с первичной открытоугольной глаукомой II стадии значительно ниже по сравнению с названными ранее и варьирует в узком диапазоне.

Это относится к IL-4, IL-6, IL-1 β и IL-18, у которых показатель информативности изменялся от 204,9 (IL-18) до 245,7 (IL-4). Более низкие величины информативности свойственны IL-7 и IL-10 с минимальным значением для IL-10.

Для разработки регрессионной модели по прогнозированию развития первичной открытоугольной глаукомы использованы наиболее информативные интерлейкины слезной жидкости. Методом пошаговой регрессии создана прогностическая модель следующего вида: $Y = 11,54 + 2,198X_1 + 4,217X_2 + 2,056X_3$, где Y – вероятность развития глаукомы, X_1 – уровень IL-17 в слезной жидкости, X_2 – уровень IL-2 в слезной жидкости, X_3 – уровень IL-8 в слезной жидкости.

Построенная математическая модель может использоваться в клинической практике, так как является адекватной по критерию Фишера ($F_{расч} = 97,2 > F_{табл} = 32,7$, $P < 0,001$). Развитие первичной открытоугольной глаукомы прогнозируется при величине $Y = 349,517 - 408,237$, а отсутствие патологии – при $Y < 349,516$.

Обсуждение

Результаты настоящего исследования, наряду с полученными ранее данными у больных с подозрением на глаукому и начальной стадией первичной открытоугольной глаукомы [4, 6, 7], свидетельствуют о важном вкладе локальных интерлейкинов в патогенез рассматриваемого заболевания.

Изменения локального цитокинового профиля при подозрении на первичную открытоугольную глаукому носили резко выраженный характер относительно «возрастного» контроля и касались 14 из 16 цитокинов, за исключением IL-8 и VEGF-A. В слезной жидкости пациентов этой группы обнаружено статистически значимое повышение содержания IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IFN α , IFN γ , TNF α , TNF β , TGF- β 1 [4].

Сравнительный анализ исследования содержания цитокинов в слезной жидкости групп «возрастного» контроля и начальной первичной открытоугольной глаукомы выявил достоверное повышение локальной продукции IL-1 β , IL-5, IL-12p70, IL-18, TNF α , TNF β , VEGF-A, TGF- β 1 у пациентов с начальной стадией заболевания [4].

Следует обратить внимание, что усиление продукции интерлейкинов на местном уровне у больных с подозрением на первичную открытоугольную глаукому сопровождалось изменениями большего числа цитокинов, а именно 14 из 16 изученных, тогда как при начальной стадии заболевания – всего лишь 8 из 16 анализируемых интерлейкинов [4]. Однако в исследованиях Л.П. Чередниченко и соавт. [6, 7] не установле-

но репрезентативных изменений в содержании в слезной жидкости IL-17, IL-4 и IL-10 у больных с подозрением на глаукому и начальной стадией первичной открытоугольной глаукомы в сравнении с группой здоровых лиц. Так, содержание в слезной жидкости названных интерлейкинов среди пациентов с подозрением на первичную открытоугольную глаукому составило, соответственно, $0,92 \pm 0,08$; $9,86 \pm 1,20$ и $11,70 \pm 0,79$ пг/мл, в группе с начальной стадией первичной открытоугольной глаукомы — $1,13 \pm 0,10$; $10,09 \pm 1,49$ и $17,66 \pm 1,70$ пг/мл против $0,89 \pm 0,09$; $8,29 \pm 1,64$ и $11,09 \pm 0,83$ пг/мл в контроле [10]. Особенно противоречивыми являются сведения об уровне IL-17, увеличение которых выявлено во многих исследованиях. В частности, в слезной жидкости в аналогичных группах больных с первичной открытоугольной глаукомой Слепова О.С. и соавт. [4] выявили увеличение IL-17, соответственно, в 4,8 раза среди пациентов с подозрением на глаукому и 2,8 раза среди больных с начальной стадией.

Более существенное повышение (в 9,0 раз) IL-17 в слезной жидкости больных с I стадией первичной открытоугольной глаукомы установлено в работе Хохловой А.С. и соавт. [5]. Это не противоречит полученным нами результатам и указывает на ведущее диагностическое значение локальных IL-17 при первичной открытоугольной глаукоме как на начальных, так и на II стадии заболевания.

Указывается, что повышение уровня IL-17 более 27 пг/мл в слезной жидкости считается ранним маркером диагностики и прогностически неблагоприятным локальным критерием для первичной открытоугольной глаукомы [2]. У больных II стадии первичной открытоугольной глаукомы среди провоспалительных цитокинов слезной жидкости, помимо повышения IL-17 до 19,60 пг/мл против 5,34 пг/мл в контроле, наблюдается увеличение IL-1 β до 8,64 против 2,6 и IL-2 — до 16,19 против 2,2 пг/мл в контроле без достоверных изменений уровня IL-6 (2,0 и 2,4 пг/мл соответственно). Нами также выявлено значительное повышение провоспалительного IL-2 в слезной жидкости больных II стадии первичной открытоугольной глаукомы.

Среди локальных противовоспалительных цитокинов на II стадии первичной открытоуголь-

ной глаукомы обнаружено достоверное снижение IL-10 и отсутствие достоверных изменений в содержании IL-4 [3]. Хохлова А.С. и соавт. [5] также выявили репрезентативное уменьшение уровня IL-10 в слезной жидкости пациентов со II стадией обсуждаемой патологии, но вместе с тем, в отличие от ранее рассмотренной работы [3], установила повышение IL-4 до 7,78 пг/мл против 4,9 в контроле. Более существенное увеличение IL-4 на локальном уровне и менее значимое снижение IL-10 выявлено в настоящем исследовании у больных со II стадией первичной открытоугольной глаукомы.

Выявленные изменения в содержании интерлейкинов в слезной жидкости больных первичной открытоугольной глаукомой на разных стадиях свидетельствуют о существенной роли локальных цитокинов, и прежде всего провоспалительных, в развитии обсуждаемой патологии, а в качестве фактора, потенцирующего гиперпродукцию названных (провоспалительных) интерлейкинов может выступать нарастание внутриглазного давления [4, 7]. Кроме того, уровни локальных интерлейкинов, наряду с данными клинико-офтальмологического обследования, следует использовать для оценки степени тяжести глаукомы [11].

Заключение

Прогрессирование первичной открытоугольной глаукомы сопровождается репрезентативным увеличением в слезной жидкости практически всех интерлейкинов, за исключением IL-10. При этом наибольшей диагностической значимостью обладают IL-2, IL-17, IL-8, которые рекомендуется применять при лабораторной диагностике и прогнозировании глаукомы. Созданная регрессионная модель с высокой безошибочной вероятностью позволяет прогнозировать развитие глаукомы по изменению содержания в слезной жидкости IL-2, IL-17, IL-8.

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Агаева Р.Б. Динамика показателей инвалидности вследствие болезней глаза в оценке эффективности диспансеризации населения Азербайджана // Казанский медицинский журнал, 2017. № 3. С. 376-381. [Agaeva R.B. Dynamics of indicators of disability caused by eye diseases in assessment of efficiency of periodic health examination of the population of Azerbaijan. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2017, no. 3, pp. 376-381. (In Russ.)]
2. Еричев В.П., Петров С.Ю., Суббот А.М., Волжанин А.В., Германова В.Н., Карлова Е.В. Роль цитокинов в патогенезе глазных болезней // Национальный журнал Глаукома, 2017. Т. 16, № 1. С. 85-99. [Erichev V.P.,

Petrov S.Yu., Subbot A.M., Volzhanin A.V., Germanova V.N., Karlova E.V. The role of cytokines in the pathogenesis of eye diseases. *Natsionalnyy zhurnal Glaukoma = National Journal Glaucoma*, 2017, Vol. 16, no. 1, pp. 85-99. (In Russ.)]

3. Маркелова Е.В., Хохлова А.С., Кириенко А.В., Филина Н.В., Серебрянная Н.Б. Особенности иммунопатогенеза и дополнительные дифференциальные маркеры первичной открытоугольной и первичной закрытоугольной глаукомы // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке», 2016. Т. 18, № 2. С. 613-621. [Markelova E.V., Khokhlova A.S., Kirienko A.V., Filina N.V., Serebryannaya N.B. Features of the immunopathogenesis and the additional differential markers of primary open angle and primary angle closure glaucoma. *Zhurnal nauchnykh statey "Zdorovye i obrazovanie v XXI veke" = Journal of Scientific Articles "Health and Education Millennium"*, 2016. Vol. 18, no. 2, pp. 613-621. (In Russ.)]

4. Слепова О.С., Арапиев М.У., Ловпаче Дж.Н., Балацкая Н.В., Куликова И.Г. Особенности местного и системного цитокинового статуса у здоровых разного возраста и пациентов с начальной стадией первичной открытоугольной глаукомы // Национальный журнал Глаукома, 2016. Т. 15, № 1. С. 3-12. [Slepova O.S., Arapiev M.U., Lovpache Dzh.N., Balatskaya N.V., Kulikova I.G. Peculiarities of local and systemic cytokine status in healthy of different age and patients with initial stage of primary open-angle glaucoma. *Natsionalnyy zhurnal Glaukoma = National Journal Glaucoma*, 2016, Vol. 15, no. 1, pp. 3-12. (In Russ.)]

5. Хохлова А.С., Кириенко А.В., Филина Н.В., Маркелова Е.В. Локальная цитокиновая регуляция на разных стадиях первичной открытоугольной глаукомы // Тихоокеанский медицинский журнал, 2014. № 4. С. 46-48. [Khokhlova A.S., Kiriyenko A.V., Filina N.V., Markelova E.V. Local cytokine regulation at different stages of primary open-angle glaucoma. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2014, no. 4, pp. 46-48. (In Russ.)]

6. Чередниченко Л.П., Барычева Л.Ю., Берновская А.А. Значение провоспалительных цитокинов в развитии первичной открытоугольной глаукомы // Медицинский вестник Северного Кавказа, 2013. Т. 8, № 2. С. 52-54. [Cherednichenko L.P., Barycheva L.Yu., Bernovskaya A.A. Importance of proinflammatory cytokines in the development of primary open-angle glaucoma. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of the North Caucasus*, 2013, Vol. 8, no. 2, pp. 52-54. (In Russ.)]

7. Чередниченко Л.П., Барычева Л.Ю., Берновская А.А. Цитокиновый профиль у пациентов с начальными проявлениями первичной открытоугольной глаукомы // Российская педиатрическая офтальмология, 2013. № 1. С. 38-42. [Cherednichenko L.P., Barycheva L.Yu., Bernovskaya A.A. Cytokine profile in patients with initial manifestations of primary open-angle glaucoma. *Rossiyskaya pediatricheskaya oftalmologiya = Russian Pediatric Ophthalmology*, 2013, no. 1, pp. 38-42. (In Russ.)]

8. Kim Y.K., Choi H.J., Jeoung J.W. Park K.H., Kim D.M. Five-year incidence of primary open-angle glaucoma and rate of progression in health center-based Korean population: the Gangnam eye study. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 12, e114058. doi: 10.1371/journal.pone.0114058.

9. Kolko M., Horwitz A., Thygesen J., Jeppesen J., Torp-Pedersen C. The prevalence and incidence of glaucoma in Denmark in a fifteen year period: a nationwide study. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 7, e0132048. doi: 10.1371/journal.pone.0132048.

10. Lazcano-Gomez G., Soohoo J.R., Lynch A., Bonell L.N., Martinez K., Turati M., Gonzalez-Salinas R., Jimenez-Roman J., Kahook M.Y. Neovascular glaucoma: a retrospective review from a tertiary eye care center in Mexico. *J. Curr. Glaucoma Pract.*, 2017, Vol. 11, no. 2, pp. 48-51.

11. Liao N., Li C., Jiang H., Fang A., Zhou S., Wang Q. Neovascular glaucoma: a retrospective review from a tertiary center in China. *BMC Ophthalmol.*, 2016, no. 16, p. 14.

12. Tham Y.C., Li X., Wong T.Y., Quigley H.A., Aung T., Cheng C.Y. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, 2014, no. 121, pp. 2081-2090.

13. Zhao Y., Fu J.L., Li Y.L., Li P., Lou F.L. Epidemiology and clinical characteristics of patients with glaucoma: an analysis of hospital data between 2003 and 2012. *Indian J. Ophthalmol.*, 2015, Vol. 63, no. 11, pp. 825-831.

Авторы:

Агарков Н.М. — д.м.н., профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

Чухрайв А.М. — д.м.н., профессор, генеральный директор ФГАУ «НМИЦ «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Яблокова Н.В. — заведующая отделением, Тамбовский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Authors:

Agarkov N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Biomedical Engineering, Southwest State University, Kursk, Russian Federation

Chukhrai A.M., PhD, MD (Medicine), Professor, General Director, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex "Eye Microsurgery", Moscow, Russian Federation

Yablokova N.V. — Head of Department, Tambov Branch S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex "Eye Microsurgery", Tambov, Russian Federation

Поступила 16.05.2019

Отправлена на доработку 24.05.2019

Принята к печати 13.09.2019

Received 16.05.2019

Revision received 24.05.2019

Accepted 13.09.2019

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ И КОСТИМУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Логаткина А.В.¹, Бондарь С.С.¹, Терехов И.В.¹, Никифоров В.С.²

¹ ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», г. Тула, Россия

² ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Ишемическая болезнь сердца представляет важную медико-социальную проблему, что определяется высокой распространенностью заболевания, неуклонным прогрессирующим течением, занимающим лидирующее место в структуре смертности.

Учитывая важную роль в прогрессировании ИБС воспалительного процесса сосудистой стенки, поддерживающегося за счет активированных макрофагов, Т-лимфоцитов и NK-клеток, очевидно, что маркеры их активации могут играть определенную роль в оценке активности иммунновоспалительного процесса, а, следовательно, использоваться для прогнозирования состояния здоровья таких пациентов.

В соответствии с вышесказанным целью настоящего исследования являлось изучение информативности растворимых форм костимуляторных молекул, а также молекул адгезии у пациентов со стенокардией напряжения и острым коронарным синдромом.

В ходе контролируемого клинического исследования обследовано 48 пациентов обоего пола с ИБС в возрасте от 55 до 70 лет, а также 15 практически здоровых лиц в возрасте 50-70 лет. Основная группа, которую составили пациенты с ИБС, была разделена на две подгруппы. В первую подгруппу включены 25 пациентов со стенокардией напряжения 2-3 функционального класса, во вторую подгруппу основной группы включены 23 пациента, поступившие в клинику с острым коронарным синдромом, сопровождавшимся подъемом сегмента ST на электрокардиограмме и оценкой по шкале GRACE от 125 до 140 баллов (средний возраст обследованных составил 68,5±5,0 лет).

В ходе исследования в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию молекул адгезии sICAM-1, sVCAM-1, лейкоцитарного (L) и тромбоцитарного (P) селектинов, sCD28, sCD40, sCD40L, sCD80, sCD152, sFas, sFasL.

Проведенный анализ показал, что у пациентов со СН имеет место повышение уровня sCD152 на 77,8 (p = 0,026), sCD40 на 22,2% (p = 0,038), sVCAM-1 в 1,98 раза (p = 0,011). Также отмечено снижение уровня L- и P-селектинов на 51,6% (p = 0,029) и 29,0% (p = 0,04) соответственно, а также sCD80 на 77,1% (p = 0,026), sCD40L на 30,8% (p = 0,041), sFas на 54,4 (p = 0,038), sFasL на 32,5% (p = 0,043). В подгруппе ОКС, в сравнении с группой контроля, отмечалось повышение уровня sCD152 на 61,1% (p = 0,029), sCD40 на 29,6% (p = 0,041), sVCAM-1 в 3,16 раза (p = 0,001). На этом фоне имело место снижение концентрации L-селектина на 71,6% (p = 0,025), P-селектина на 32,1% (p = 0,043), sCD80 на

Адрес для переписки:

Терехов Игорь Владимирович
ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»
300012, Россия, г. Тула, ул. Смидович, 12.
Тел.: 8 (906) 509-80-19.
E-mail: trft@mail.ru

Address for correspondence:

Terekhov Igor V.
Tula State University
300012, Russian Federation, Tula, Smidovich str., 12.
Phone: 7 (906) 509-80-19.
E-mail: trft@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Логаткина, С.С. Бондарь, И.В. Терехов, В.С. Никифоров «Диагностическая ценность растворимых молекул адгезии и костимуляторных молекул иммунокомпетентных клеток у больных ишемической болезнью сердца» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1169-1178.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1169-1178
© Логаткина А.В. и соавт., 2019

For citation:

A.V. Logatkina, I.V. Terekhov, S.S. Bondar, V.S. Nikiforov
“Diagnostic significance of soluble adhesion molecules and costimulatory molecules of immune cells in the patients with ischemic heart disease”, Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1169-1178.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1169-1178
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1169-1178

76,4% ($p = 0,023$), sCD28 на 48,1% ($p = 0,038$), sCD40 на 29,6% ($p = 0,046$), sCD40L на 28,2% ($p = 0,045$), sFas на 48,5% ($p = 0,041$), sFasL на 12,5% ($p = 0,05$). У пациентов с ОКС, в сравнении со СН, отмечено снижение экспрессии L-селектина на 41,3% ($p = 0,033$), sCD28 на 30,1% ($p = 0,036$), sFasL на 29,6% ($p = 0,041$), sFas на 12,5% ($p = 0,06$), при повышении уровня sVCAM-1 на 59,0% ($p = 0,027$).

У обследованных больных ИБС выявлен повышенный уровень sCD152, sCD40 и sVCAM-1, при снижении экспрессии L- и P-селектинов, sCD80, sCD40L, а также sFas и sFasL. На фоне ОКС отмечается дальнейшее снижение экспрессии L-селектина, sVCAM-1, sCD28, sFasL и sFas, а также наблюдается относительное повышение уровня FasL над уровнем Fas. Наиболее точными маркерами ОКС являются L-селектин, информативность которого составляет 91% при диагностическом значении 7,7 нг/мл (95% ДИ 78-98%), а также FasL с информативностью 93% (84-99%) при диагностическом значении 3,1 нг/мл. Выявленные характерные для ОКС изменения исследованных маркеров, в частности повышение уровня FasL и снижение CD28, указывают на возможную патогенетическую связь развития обострения ИБС с дисбалансом активности Т-регуляторных лимфоцитов и Т-хелперов 17, а также повышенной активацией процессов апоптоза эндотелиоцитов коронарных артерий.

Ключевые слова: белки адгезии, сыворотка крови, костимуляторные факторы, иммунокомпетентные клетки, ишемическая болезнь сердца

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF SOLUBLE ADHESION MOLECULES AND COSTIMULATORY MOLECULES OF IMMUNE CELLS IN THE PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

Logatkina A.V.^a, Terekhov I.V.^a, Bondar S.S.^a, Nikiforov V.S.^b

^a Tula State University, Tula, Russian Federation

^b I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Ischemic heart disease (IHD) represents significant medical issues, due to high prevalence of the disorder, permanent progressive course, being a leading cause of mortality. With respect to important role of vascular wall inflammation in IHT supported by the inflammatory macrophages, T cells and NK cells, one should conclude that their activation markers may play certain role in evaluation of intensity of immune inflammation, and, therefore, they could be used for prediction of health consequences for the patients. Hence, the aim of this study was to assess diagnostic value of soluble co-stimulatory molecules, as well as adhesion molecules in the patients with effort angina and acute coronary syndrome. In the course of controlled clinical study, we have examined 48 patients with IHD, of both genders at the age of 55 to 70 years, as well as 15 healthy persons aged 50 to 70 лет. The main group of IHD patients was divided into 2 subgroups: the 1st subgroup included 25 cases with effort angina, functional class 2-3; the 2nd subgroup consisted of 23 patients admitted to the clinic with acute coronary syndrome with ST elevation on ECG, and GRACE score of 125 to 140 points. The mean age of the observed patients was 68.5 ± 5.0 years old). In the course of the study, serum contents of adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, leukocyte (L) and platelet (P) selectins), like as sCD28, sCD40, sCD40L, sCD80, sCD152, sFas, sFasL were measured by means of immunoenzyme technique. The data analysis has shown an increase of sCD152 levels by 77.8% ($p = 0.026$); sCD40 elevated by 22.2% ($p = 0.038$), and sVCAM was increased 1.98-fold ($p = 0.011$) in the effort angina patients. Similarly, we revealed a decrease in L- and P-selectins, respectively, by 51.6% ($p = 0.029$), and 29.0 % ($p = 0.04$), as well as decrease of sCD80 by 77.1% ($p = 0.026$); sCD40L by 30.8% ($p = 0.041$), sFas by 54.4 ($p = 0.038$), sFasL на 32.5% ($p = 0.043$). In acute coronary syndrome, if compared to control group, an increase in sCD152 was found by 61.1% ($p = 0.029$); sCD40 by 29.6% ($p = 0.041$); sVCAM-1 was elevated 3.16-fold ($p = 0.001$), along with decreased concentrations of L-selectin by 71.6% ($p = 0.025$); P-selectin by на 32.1% ($p = 0.043$); sCD80 by 76.4% ($p = 0.023$); sCD28 by 48.1% ($p = 0.038$); sCD40 by 29.6% ($p = 0.046$); sCD40L by 28.2% ($p = 0.045$); sFas by 48.5% ($p = 0.041$); sFasL by 12.5% ($p = 0.05$). The patients with acute coronary syndrome, in comparison with effort angina, exhibited a diminished L-selectin expression by 41.3% ($p = 0.033$); sCD28 by 30.1% ($p = 0.036$); sFasL by 29.6% ($p = 0.041$); sFas by 12.5% ($p = 0.06$), whereas sVCAM-1 levels were increased by 59.0% ($p = 0.027$). The examined patients with IHD exhibited increased levels of serum sCD152,

sCD40 and sVCAM-1, along with decreased expression of L- and P-selectins, sCD80, sCD40L, as well as sFas and sFasL. In presence of acute coronary syndrome, a more pronounced drop in L-selectin, sVCAM-1, sCD28, sFasL and sFas expression like as relative increase of FasL over Fas levels. L-selectin is the most precise marker of acute coronary syndrome, with informativity of 91% and diagnostic threshold of 7.7 ng/mL (95% CI, 78-98%), as well as FasL with informativity of 93% (84-99%) and diagnostic value of 3.1 ng/mL. The detected changes of the markers studied in acute coronary syndrome, in particular, increased FasL levels and diminished CD28 presume a possible pathogenetic relation between development of the IHD exacerbation and imbalance between T-regulatory lymphocytes and Th17 helper cells as well as pronounced apoptosis activation of endotheliocytes in coronary arteria.

Keywords: adherence proteins, blood serum, costimulatory factors, immune cells, ischemic heart disease

Введение

Ишемическая болезнь сердца представляет важную медико-социальную проблему, что определяется высокой распространенностью заболевания, неуклонным прогрессирующим течением, занимающим лидирующее место в структуре смертности в возрастной категории старше 60 лет [3]. При этом проблема прогнозирования течения ИБС представляет особую актуальность в связи с необходимостью своевременной диагностики обострения заболевания и проведения мероприятий по предупреждению развития инфаркта миокарда, ассоциированного с тромбозом коронарных артерий [3, 5].

Учитывая важную роль в прогрессировании ИБС воспалительного процесса сосудистой стенки, поддерживающегося за счет активированных макрофагов, Т-лимфоцитов и НК-клеток, очевидно, что маркеры их активации могут играть определенную роль в оценке активности иммунновоспалительного процесса, а, следовательно, использоваться для прогнозирования состояния здоровья таких пациентов [1, 2, 9, 10, 13]. При этом установлено, что в процессах активации внутрисосудистого воспаления при ИБС и развитии ОКС важную роль играет нарушение взаимодействий между регуляторными Т-лимфоцитами и Т-хелперами 17 типа за счет нарушения экспрессии корцепторных молекул, в том числе CD28, CD80, CD152, а также повышение активности цитотоксических лимфоцитов, включая НК-клетки, что проявляется повышением экспрессии на них молекулы FasL [9, 11].

При этом провоспалительная стимуляция эндотелия при ОКС сопровождается повышенной экспрессией молекул адгезии, в частности ICAM-1, VCAM-1, тогда как на тромбоцитах и лейкоцитах повышается экспрессия селектинов, что определяет снижение тромборезистентности эндотелия, играющего важную роль в формировании пристеночных тромбов в коронарных артериях с развитием нестабильной стенокардии или инфаркта миокарда [2, 14].

В свою очередь, на фоне дезагрегантной терапии, применения гиполипидемических средств и других препаратов, применяемых в лечении ИБС, отмечается снижение провоспалительной активации клеток крови, что проявляется, в частности, снижением экспрессии молекул адгезии: L-селектина, VCAM-1, ICAM-1 [7, 8]. При этом уровень экспрессии молекул на цитоплазматических мембранах ИКК находится в прямой корреляции с уровнем их растворимых форм, попадающих в системный кровоток в результате шеддинга [1, 11]. Показано, что уровень отдельных растворимых форм, коррелирующий с их экспрессией на клетках, может служить диагностическим критерием развития ОКС, прогнозирования исходов инфаркта миокарда и т. п. [1, 2]. Вместе с тем информативность растворимых форм костимуляторных молекул, молекул, регулирующих процессы апоптоза, а также молекул адгезии у пациентов с ОКС в настоящее время исследованы недостаточно полно.

В соответствии с вышесказанным **целью настоящего исследования** являлось изучение информативности растворимых форм костимуляторных молекул, а также молекул адгезии у пациентов со стенокардией напряжения и острым коронарным синдромом.

Материалы и методы

В ходе контролируемого клинического исследования обследовано 48 пациентов обоего пола с ИБС в возрасте от 55 до 70 лет, а также 15 практически здоровых лиц в возрасте 50-70 лет. Основная группа, которую составили пациенты с ИБС, была разделена на две подгруппы. В первую подгруппу включены 25 пациентов со стенокардией напряжения 2-3 функционального класса (СН), во вторую подгруппу основной группы включены 23 пациента, поступившие в клинику с острым коронарным синдромом (ОКС), сопровождавшимся подъемом сегмента ST на электрокардиограмме и оценкой по шкале GRACE от 110

до 140 баллов (средний возраст обследованных составил $68,5 \pm 5,0$ лет).

Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Саратовского военно-медицинского института. Перед включением в исследование у каждого участника было получено информированное согласие. Пациенты со стенокардией напряжения в течение всего периода нахождения в клинике (среднее пребывание $13,0 \pm 2,0$ сут.) получали гипотензивную терапию (иАПФ, БАБ) утром и вечером, диуретики (индапамид-ретард, 1,5 мг однократно утром), статины, ацетилсалициловая кислота. Пациентам группы с ОКС на догоспитальном этапе был назначен клопидогрель в дозе 300 мг, ацетилсалициловая кислота 100 мг, эноксапарин из расчета 1 мг/кг, 1 мл 2% раствора промедола. При поступлении были назначены БАБ, иАПФ и статины.

В ходе исследования в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию молекул адгезии sICAM-1, sVCAM-1, лейкоцитарного (L) и тромбоцитарного (P) селектинов, sCD28, sCD40, sCD40L, sCD80, sCD152, sFas, sFasL. ИФА проводился на анализаторе Personal LAB (Adaltis Italia S.p.A., Италия), с использованием реагентов фирмы BenderMedSystems (Австрия). Забор крови для исследования проводили из локтевой вены, натощак, в утренние часы (с 7:00 до 7:40).

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 7.0 (StatSoft, США). Данные исследования представляли в виде среднего значения, 25 и 75 перцентилей и медианы (Me) выборки. Сравнение средних значений производили с помощью U-критерия Манна–Уитни, взаимосвязи изучаемых факторов исследовали методом линейного корреляционного анализа. Информативность диагностических показателей исследовали методом характеристического (ROC) анализа.

Результаты

Уровень растворимых форм исследуемых молекул представлен в таблице 1.

Проведенный анализ показал, что у пациентов с СН имеет место повышение уровня в системном кровотоке растворимой формы CD152 на 77,8 ($p = 0,026$), CD40 – на 22,2% ($p = 0,038$), а VCAM-1 – в 1,98 раза ($p = 0,011$). В то же время в данной группе отмечалось снижение концентрации растворимой формы L- и P-селектинов на 51,6 ($p = 0,029$) и 29,0% ($p = 0,04$) соответственно, а также CD80 – на 77,1% ($p = 0,026$), CD40L – на 30,8% ($p = 0,041$). Также у обследованных пациентов выявлено снижение уровня растворимой формы маркеров апоптоза – Fas

и FasL на 54,4 ($p = 0,038$) и 32,5% ($p = 0,043$) соответственно.

В подгруппе пациентов с ОКС, в сравнении с практически здоровыми лицами, отмечалось повышение уровня CD152 на 61,1% ($p = 0,029$), CD40 на 29,6% ($p = 0,041$), а VCAM-1 в 3,16 раза ($p = 0,001$). На этом фоне имело место снижение концентрации L-селектина на 71,6% ($p = 0,025$), P-селектина – на 32,1% ($p = 0,043$), CD80 – на 76,4% ($p = 0,023$), CD28 – на 48,1% ($p = 0,038$), CD40 – на 29,6% ($p = 0,046$), CD40L – на 28,2% ($p = 0,045$), Fas – на 48,5% ($p = 0,041$), FasL – на 12,5% ($p = 0,05$).

Проведенный анализ также выявил, что у пациентов с ОКС, в сравнении с СН, наблюдается снижение экспрессии L-селектина на 41,3% ($p = 0,033$), CD28 – на 30,1% ($p = 0,036$), FasL – на 29,6% ($p = 0,041$), Fas – на 12,5% ($p = 0,06$), CD152 – на 9,4% ($p = 0,061$), при повышении уровня VCAM-1 на 59,0% ($p = 0,027$). В отношении концентрации остальных медиаторов статистически значимых межгрупповых различий выявлено не было.

С учетом выявленных различий экспрессии исследованных маркеров у пациентов с ОКС и СН, с целью определения их информативности в дифференциальной диагностике данных патологических состояний, был выполнен характеристический (ROC) анализ, результаты которого представлены в таблице 2.

Результаты ROC-анализа свидетельствуют о том, что из всех исследованных маркеров уровень растворимых форм VCAM-1, L- селектина, CD28 и FasL отличается наибольшей информативностью, позволяющей дифференцировать между собой стабильное течение ИБС и развитие ОКС. На рисунке 1 представлены характеристические (ROC) кривые для исследованных маркеров.

Анализ полученных характеристических кривых свидетельствует о наиболее высокой информативности уровня L-селектина и FasL в дифференциации исследуемых состояний. При этом первый маркер проявляет отрицательную информативность, второй – положительную. При этом повышение уровня растворимой формы L-селектина будет снижать вероятность ОКС, тогда как повышение концентрации в сыворотке лиганда активатора апоптоза Fas, напротив, свидетельствовать в пользу развития НС.

Проведенный корреляционный анализ выявил умеренную отрицательную корреляцию растворимого уровня Fas и VCAM-1 ($r = -0,65$; $p = 0,011$), а также Fas и CD28 ($r = -0,5$; $p = 0,038$). Кроме этого, выявлена сильная статистически значимая положительная взаимосвязь уровня CD28 и VCAM-1 ($r = -0,68$; $p = 0,01$). Значимых

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ИССЛЕДОВАННЫХ ФАКТОРОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ОБСЛЕДОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. CONCENTRATION OF THE STUDIED FACTORS IN THE BLOOD SERUM OF THE EXAMINED PATIENTS

Фактор, нг/мл Factor, ng/ml	Контрольная группа Control group		Стенокардия напряжения Angina pectoris		Острый коронарный синдром Acute coronary syndrome	
	х	Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) %	х	Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) %	х	Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) %
sVCAM-1	121,5	121,7 (118,9-124,4)	241,5	239,5 (213,2-262,4)	384,0	377,4 (339,3-440,4)
sL-селектин sL-selectin	21,5	21,7 (18,9-24,4)	10,4	10,1 (6,8-11,8)	6,1	6,6 (4,5-7,2)
sP-селектин sP-selectin	22,4	22,8 (20,0-23,8)	15,9	14,1 (12,3-17,4)	15,2	15,3 (14,3-16,0)
sCD80	25,8	25,9 (22,9-28,4)	5,9	6,1 (5,2-6,8)	6,1	6,3 (5,8-6,4)
sCD28	23,7	23,8 (21,6-25,9)	17,6	16,8 (12,1-23,2)	12,3	10,9 (10,0-14,5)
sCD40	2,7	2,6 (2,5-3,1)	3,3	3,2 (3,1-3,4)	3,5	3,6 (3,2-3,9)
sCD40L	3,9	4,3 (2,7-4,8)	2,7	2,7 (2,7-2,8)	2,8	2,7 (2,5-3,1)
sCD152	1,8	1,5 (1,1-2,4)	3,2	3,3 (2,9-3,7)	2,9	2,9 (2,4-3,3)
sFas	6,8	6,4 (5,9-7,8)	3,1	3,3 (2,6-3,6)	3,5	3,5 (3,0-3,6)
sFasL	4,0	3,8 (3,6-4,3)	2,7	2,6 (2,2-3,0)	3,5	3,6 (2,7-4,2)

корреляций экспрессии L-селектина с молекулами VCAM, CD28 и Fas в группе СН выявлено не было. Таким образом, экспрессия костимуляторной молекулы CD28 и молекулы адгезии VCAM-1 находится в обратной зависимости от активности процессов апоптоза, при этом положительная взаимосвязь экспрессии CD28 и VCAM-1 позволяет говорить об активации у пациентов с СН Т-клеток, в частности Т-регуляторных лим-

фоцитов, в функционировании которых важную роль играет взаимодействие CD28 и VCAM-1 [11].

Результаты исследования взаимосвязей экспрессии маркеров в группе ОКС свидетельствуют о сильной отрицательной корреляции CD28 и L-селектина ($r = -0,64$; $p = 0,012$) и умеренной CD28 и VCAM-1 ($r = -0,47$; $p = 0,041$). Отрицательный характер корреляции указанных маркеров, необходимых для обеспечения нормального функционирования Т-лимфоцитов, в том числе

ТАБЛИЦА 2. ОЦЕНКИ ИНФОРМАТИВНОСТИ ИССЛЕДОВАННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

TABLE 2. ASSESSMENT OF THE INFORMATION CONTENT OF THE STUDIED INDICATORS

Маркер Marker	AUC	m	p	95% ДИ 95% CI		ДЗ, нг/мл DV, ng/ml	Ч, % S, %	С, % Se, %
				-95%	+95%			
sVCAM-1	0,83	0,10	0,010	0,58	0,96	344,2	75,0	85,0
sL-селектин sL-selectin	0,91	0,08	0,002	0,78	0,98	7,7	87,5	84,6
sP-селектин sP-selectin	0,56	0,12	0,600	0,33	0,78	15,6	68,8	69,2
sCD80	0,54	0,10	0,680	0,33	0,75	6,4	68,8	65,4
sCD28	0,79	0,09	0,006	0,61	0,96	11,8	56,3	76,9
sCD40	0,64	0,10	0,180	0,44	0,84	3,4	60,5	57,7
sCD40L	0,63	0,12	0,900	0,37	0,83	28,1	50,0	85,0
sCD152	0,70	0,10	0,130	0,46	0,85	2,7	50,0	69,2
sFas	0,62	0,1	0,250	0,42	0,82	3,6	75,0	53,8
sFasL	0,93	0,08	0,004	0,84	0,99	3,1	87,5	88,5

Примечание. AUC – площадь под ROC-кривой; m – стандартная ошибка оценки; p – уровень значимости, 95% ДИ – границы 95% доверительного интервала информативности критерия (точности диагностики); ДЗ – диагностическое значение маркера; Ч, С, % – величина чувствительности и специфичности маркера при указанном диагностическом значении.

Note. AUC, the area under the ROC-curve; m, the standard error of estimation; p, the significance level; 95% CI, the border of the 95% confidence interval of the information content of the criterion (diagnostic accuracy); DV, the diagnostic value of the marker; Se, Sp, the value the sensitivity and specificity of the marker at the specified diagnostic value.

миграции их в ткани, позволяет говорить о возможном нарушении у данных пациентов функциональной активности иммунокомпетентных клеток, что может играть определенную роль в прогрессировании атеросклероза и развитии обострения ИБС [10, 13, 14].

Проведенный анализ свидетельствует о важном патогенетическом значении экспрессии

исследованных молекул у пациентов с ИБС, определяющемся их участием в процессах физиологической активации эндотелия, поддержании провоспалительной активности иммунокомпетентных клеток, а также в межклеточных взаимодействиях, включая кооперацию между антигенпрезентирующими клетками, эндотелием и Т-лимфоцитами [1, 2, 4, 6, 9].

При этом у обследованных больных имеет место повышение концентрации в сыворотке растворимой формы CD152, связанное, очевидно, с усилением экспрессии данной молекулы на Т-регуляторных клетках. С учетом роли CD152 в патогенезе атеросклероза, заключающейся в торможении формирования атеросклеротических бляшек, повышение экспрессии данной молекулы у пациентов с ИБС отражает состояние процессов саногенеза. При этом наблюдающееся снижение уровня CD152 у пациентов с ОКС, в сравнении с СН, определяет важную роль ограничения Т-клеточной активации в прогрессировании ИБС [13, 15].

Кроме того, выявленное повышение в основной группе экспрессии CD40 позволяет предполагать повышение у пациентов с ИБС активности макрофагов, то есть механизмов врожденного иммунного ответа. Проведенный анализ показал, что у таких пациентов имеет место пропорциональное снижение экспрессии CD40L, что компенсирует повышенный уровень экспрессии CD40, позволяя, в целом, сохранить нормальную реактивность врожденных механизмов иммунного ответа связанных с активацией макрофагов [15].

Проведенный анализ также свидетельствует о том, что ИБС ассоциируется со снижением экспрессии молекулы CD28, экспрессирующейся преимущественно на Т-лимфоцитах, и CD80, представленной на АПК. При этом указанные молекулы являются корецепторами, способствующими формированию эффективных межклеточных коопераций при формировании иммунного ответа, в том числе поддержании воспалительной реакции за счет стимуляции продукции IL-6. Проведенный анализ показал, что в основной группе отмечается более выраженное снижение уровня CD80 в сравнении с CD28. Указанное обстоятельство определяет относительное превышение экспрессии CD28 над CD80 и позволяет предполагать более сильную, но избирательную активацию Т-лимфоцитов при их контакте с АПК [11]. При этом выявлено, что при ОКС отмечается дальнейшее снижение экспрессии CD28, носящее статистически значимый характер. И, как показали результаты ROC-анализа, уровень CD28 может рассматриваться в качестве дифференциально-диагностического маркера, позволяющего идентифицировать пациентов с ОКС.

В настоящем исследовании было выявлено снижение у пациентов с ИБС уровня растворимых форм селектинов, при этом уровень L-селектина на фоне развития ОКС статистически значимо уменьшался в сравнении с пациентами со стенокардией напряжения, тогда как в

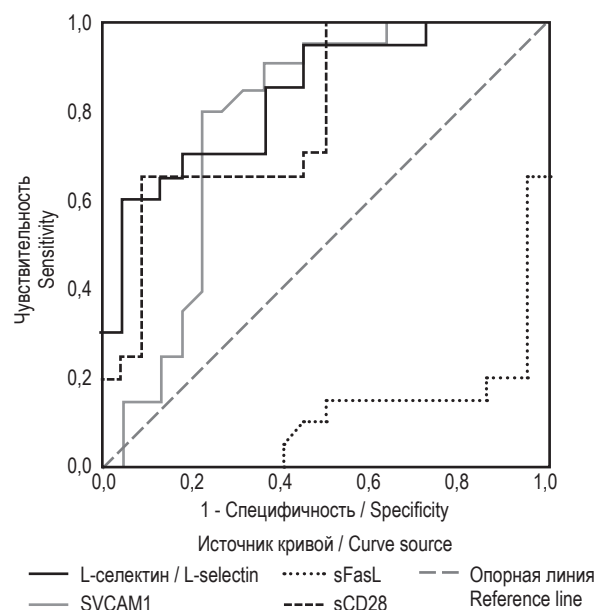


Рисунок 1. Характеристические кривые исследованных показателей

Figure 1. Characteristic curves of the studied indicators

уровне Р-селектина существенных различий у пациентов с ОКС и СН отмечено не было. В то же время на фоне развития ОКС отмечалось повышение уровня растворимой формы молекулы адгезии сосудистого эндотелия – VCAM-1, определяющее повышение адгезивных свойств эндотелия и снижение тромборезистентности у таких пациентов [4, 5].

Установлено, что снижение растворимых форм молекул адгезии, в частности, L- и P-селектина, является маркером хронического воспаления, при этом в условиях длительной провоспалительной стимуляции отмечается снижение экспрессии мембранных форм, что приводит к уменьшению соответствующих концентраций растворимых молекул [14]. Вместе с тем дополнительное снижение экспрессии L-селектина при ОКС, очевидно, также связано с интенсивной терапией, в том числе с использованием противовоспалительных средств у пациентов с СН, таких как статины и клопидогрель, а также применением наркотических анагетиков на догоспитальном этапе, что также приводит к уменьшению экспрессии на лейкоцитах молекул адгезии и тем самым к снижению уровня их растворимых форм [8].

Проведенный анализ также выявил снижение в основной группе уровня растворимых молекул, регулирующих апоптоз. При этом у пациентов с ИБС более существенно сокращался уровень растворимой формы рецептора апоптоза – молекулы Fas, в сравнении с концентрацией его лиганда. Результаты исследования свидетельствуют о том, что в подгруппе ОКС, в сравнении с подгруппой СН, отмечалось повышение уров-

ня FasL на 29,6%, при повышении Fas на 12,9%. Таким образом, у пациентов с ОКС отмечается относительный избыток растворимой формы FasL, очевидно, по причине усиления экспрессии FasL активированными цитотоксическими Т-лимфоцитами. Указанное обстоятельство играет важную роль в прогрессировании атеросклероза и развитии его осложнений, в том числе тромбоза коронарных артерий [8, 12]. Повышенная активность цитотоксических Т-лимфоцитов у пациентов с ИБС ассоциирована с повреждением миокарда, развитием фиброза и его патологическим ремоделированием, усугубляющим течение хронической сердечной недостаточности [9, 11].

При этом повышение уровня FasL, активирующего Fas-зависимый апоптоз, в том числе в иммунокомпетентных клетках, в первую очередь Т-лимфоцитах, определяет возможность формирования дисбаланса регуляции адаптивного иммунного ответа в связи с дифференциальной экспрессией молекулы Fas на Т-лимфоцитах. Так как Т-регуляторные лимфоциты, в сравнении с Т-хелперами 17, более чувствительны к Fas-зависимому апоптозу, при соответствующих условиях происходит формирование дисбаланса активности Т-регуляторных лимфоцитов и Т-хелперов 17 с усилением провоспалительных воздействий на сосудистую стенку [10]. Кроме этого, показано, что Fas-опосредованные механизмы играют важную роль в апоптозе эндотелиоцитов коронарных артерий, а также в активации в них каспазы-1 и продукции провоспалительных цитокинов семейства IL-1, поддерживающих локальное сосудистое воспаление [12]. В этой связи следует отметить, что повышение уровня растворимых форм FasL и Fas, определяющееся повышенной экспрессией данных молекул и отмечающееся у пациентов с ОКС, способно стимулировать провоспалительные механизмы, направленные на поддержание внутрисосудистого воспаления, деструкции атеросклеротической бляшки и т. п.

Вместе с тем, на фоне снижения экспрессии молекул адгезии и запрограммированной клеточной гибели, у обследованных пациентов отмечаются признаки нарушения регуляции межклеточных взаимосвязей, в том числе между участниками врожденного (АПК, макрофаги) и адаптивного иммунного ответа, в частности Т-регуляторными лимфоцитами и Т-хелперами, на что также обращалось внимание в ранее проводимых исследованиях [2, 6].

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о важной роли исследованных маркеров межклеточных взаимодействий в патогенезе ИБС, в том числе обо-

стрения заболевания и развитии ОКС. При этом уровень таких факторов, как растворимые формы VCAM-1, L-селектина, CD28 и FasL, участвующих в патогенезе ИБС, могут быть использованы в диагностике обострения заболевания и приверженности пациента к антиагрегантной и гиполипидемической терапии. Выявленные характерные для ОКС изменения исследованных маркеров — повышение уровня FasL и снижение CD28 — указывают на возможную патогенетическую связь развития обострения ИБС с дисрегуляцией адаптивного иммунного ответа, в частности дисбалансом активности Т-регуляторных лимфоцитов и Т-хелперов 17, повышением активности цитотоксических лимфоцитов, а также стимуляцией процессов апоптоза эндотелиоцитов КА и ремоделированием миокарда, приводящих к прогрессированию сердечной недостаточности [9, 10, 12].

Выводы

1. ИБС протекает на фоне повышенного сывороточного уровня растворимой формы CD152, CD40 и VCAM-1, при снижении экспрессии L- и P-селектинов, CD80, CD40L, а также Fas и FasL. У пациентов с ОКС отмечается дальнейшее снижение экспрессии L-селектина, VCAM-1, CD28, FasL и Fas. Вместе с тем течение ОКС ассоциировано с относительным повышением уровня FasL над уровнем Fas, что указывает на более существенную активацию у таких пациентов цитотоксических Т-лимфоцитов.

2. Уровни молекул VCAM-1, L-селектина, CD28 и FasL, участвующих в патогенезе ИБС, могут быть использованы в диагностике обострения заболевания и прогнозировании течения ИБС. При этом по результатам ROC-анализа наиболее точными маркерами ОКС являются L-селектин, информативность которого составляет 91% при диагностическом значении 7,7 нг/мл (95% ДИ 78-98%), а также FasL с информативностью 93% (84-99%) при диагностическом значении 3,1 нг/мл.

3. Выявленные характерные для ОКС изменения исследованных маркеров — повышение уровня FasL и снижение CD28 — указывают на возможную патогенетическую связь развития обострения ИБС с дисрегуляцией адаптивного иммунного ответа, в частности дисбалансом Т-регуляторных лимфоцитов и Т-хелперов 17, а также повышенной активацией процессов апоптоза эндотелиоцитов КА. Указанное обстоятельство определяет целесообразность более детального исследования роли нарушений межклеточных взаимодействий в патогенезе ОКС с целью оптимизации медикаментозной терапии таких пациентов.

Список литературы / References

1. Белокопытова И.С., Москалец О.В., Палеев Ф.Н., Зотова О.В. Диагностическое значение растворимых молекул адгезии sICAM-1 и sVCAM-1 при ишемической болезни сердца // Атеросклероз и дислипидемии, 2013. Т. 4, № 12. С. 62-65. [Belokopytova I.S., Moskalets O.V., Paleev F.N., Zotova O.V. The diagnostic value of adhesive molecules sICAM -1 and sVCAM-1 in ischemic heart disease. *Ateroskleroz i dislipidemii = Atherosclerosis and Dyslipidemia*, 2013, Vol. 4, no. 12, pp. 62-65. (In Russ.)]
2. Логаткина А.В., Никифоров В.С., Бондарь С.С., Терехов И.В. Воспалительные цитокины и сигнальные системы мононуклеарных клеток периферической крови при ишемической болезни сердца // Клиническая медицина, 2017. Т. 95, № 3. С. 238-244. [Logatkina A.V., Nikiforov V.S., Bondar S.S., Terekhov I.V. Proinflammatory cytokines and signaling pathways in peripheral blood mononuclear cells in patients with coronary artery disease. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine (Russian Journal)*, 2017, Vol. 95, no. 3, pp. 238-244. (In Russ.)]
3. Рекомендации по лечению стабильной ишемической болезни сердца. ESC 2013 // Российский кардиологический журнал, 2014. Т. 7, № 111. С. 7-79. [The Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal = Russian Journal of Cardiology*, 2014, Vol. 7, no. 111, pp. 7-79. (In Russ.)]
4. Стаценко М.Е., Деревянченко М.В. Роль системного воспаления в снижении эластичности магистральных артерий и прогрессировании эндотелиальной дисфункции у больных артериальной гипертензией в сочетании с ожирением, сахарным диабетом 2 типа // Российский кардиологический журнал, 2018. № 4. С. 32-36. [Statsenko M.E., Derevyanchenko M.V. The role of systemic inflammation in decrease of elasticity of magistral arteries and in progression of endothelial dysfunction in patients with systemic hypertension, obesity and type 2 diabetes. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal = Russian Journal of Cardiology*, 2018, Vol. 4, no. 156, pp. 32-36. (In Russ.)]
5. Сысоев К.А. Морфофункциональные изменения эндотелия в патогенезе гипертонической болезни // Артериальная гипертензия, 2017. Т. 23, № 5. С. 447-456. [Sysoev K.A. Morphofunctional alterations in endothelium in the pathogenesis of essential hypertension. *Arterialnaya gipertenziya = Arterial Hypertension*, 2017, Vol. 23, no. 5, pp. 447-456. (In Russ.)]
6. Хадарцев А.А., Логаткина А.В., Терехов И.В., Бондарь С.С. Динамика проявлений метаболического синдрома у пациентов с артериальной гипертензией на фоне комплексного использования низкоинтенсивной микроволновой терапии // Артериальная гипертензия, 2018. Т. 24, № 2. С. 206-216. [Khadartsev A.A., Logatkina A.V., Terekhov I.V., Bondar S.S. Metabolic changes in hypertensive patients treated by low-intensity microwave therapy. *Arterialnaya gipertenziya = Arterial Hypertension*, 2018, Vol. 24, no. 2, pp. 206-216. (In Russ.)]
7. An X., Jiang G., Cheng C., Lv Z., Liu Y., Wang F. Inhibition of platelets by clopidogrel suppressed Ang II-Induced vascular inflammation, oxidative stress, and remodeling. *J. Am. Heart Assoc.*, 2018, Vol. 7, no. 21, e009600. doi: 10.1161/JAHA.118.009600.
8. Atalar E., Ozmen F., Haznedaroglu I., Açıl T., Ozer N., Ovünç K., Aksöyek S., Kes S. Effects of short-term atorvastatin treatment on global fibrinolytic capacity, and sL-selectin and sFas levels in hyperlipidemic patients with coronary artery disease. *Int. J. Cardiol.*, 2002, Vol. 84, no. 2-3, pp. 227-231.
9. Bansal S.S., Ismahil M.A., Goel M. Activated T lymphocytes are essential drivers of pathological remodeling in ischemic heart failure. *Circ. Heart Fail.*, 2017, Vol. 10, no. 3, e003688. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003688.
10. Cheng X., Liao Y.H., Ge H., Li B., Zhang J., Yuan J., Wang M., Liu Y., Guo Z., Chen J., Zhang J., Zhang L. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin. Immunol.*, 2008, no. 127, pp. 89-97.
11. Damle N.K., Klussman K., Leytze G., Ochs H.D., Aruffo A., Linsley P.S., Ledbetter J.A. Costimulation via vascular cell adhesion molecule-1 induces in T cells increased responsiveness to the CD28 counter-receptor B7. *Cell. Immunol.*, 1993, Vol. 148, no. 1, pp. 144-156.
12. Filippatos G., Ang E., Gidea C., Dincer E., Wang R., Uhal B.D. Fas induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells *in vitro*. *BMC Cell Biol.*, 2004, no. 5, p. 6.
13. Foks A.C., Kuiper J. Immune checkpoint proteins: exploring their therapeutic potential to regulate atherosclerosis. *Br. J. Pharmacol.*, 2017, Vol. 174, no. 22, pp. 3940-3955.
14. Haught W.H., Mansour M., Rothlein R., Kishimoto T.K., Mainolfi E.A., Hendricks J.B., Hendricks C., Mehta J.L. Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am. Heart J.*, 1996, Vol. 132, no. 1, pp. 1-8.
15. Jansen M.F., Hollander M.R., van Royen N., Horrevoets A.J., Lutgens E. CD40 in coronary artery disease: a matter of macrophages? *Basic Res. Cardiol.*, 2016, Vol. 111, no. 4, p. 38.
16. Kyaw T., Peter K., Li Y., Tipping P., Toh B.H., Bobik A. Cytotoxic lymphocytes and atherosclerosis: significance, mechanisms and therapeutic challenges. *Br. J. Pharmacol.*, 2017, Vol. 174, no. 22, pp. 3956-3972.
17. Li Q., Wang Y., Wang Y., Zhou Q., Chen K., Wang Y.M., Wei W., Wang Y. Distinct different sensitivity of Treg and Th17 cells to Fas-mediated apoptosis signaling in patients with acute coronary syndrome. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2013, Vol. 6, no. 2, pp. 297-307.
18. Rahmati Z., Amirzargar A.A., Saadati S., Rahmani F., Mahmoudi M.J., Rahnemoon Z., Eskandari V., Gorzin F., Hedayat M., Rezaei N. Association of levels of interleukin 17 and T-helper 17 count with symptom severity and etiology of chronic heart failure: a case-control study. *Croat. Med. J.*, 2018, Vol. 59, no. 4, pp. 139-148.

19. Sahinarslan A., Boyaci B., Kocaman S.A., Topal S., Ercin U., Okay K., Bukan N., Yalçın R., Cengel A. The relationship of serum soluble fas ligand (sFasL) level with the extent of coronary artery disease. *Int. J. Angiol.*, 2012, Vol. 21, no. 1, pp. 29-34.
20. Walter T., Suselbeck T., Borggreffe M., Swoboda S., Hoffmeister H.M., Dempfle C.E. Effect of atorvastatin on cellular adhesion molecules on leukocytes in patients with normocholesterolemic coronary artery disease. *In Vivo*, 2010, Vol. 24, no. 2, pp. 189-193.

Авторы:

Логаткина А.В. — аспирант кафедры внутренних болезней Медицинского института ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», г. Тула, Россия

Терехов И.В. — к.м.н., доцент кафедры общей патологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», г. Тула, Россия

Бондарь С.С. — аспирант кафедры внутренних болезней Медицинского института ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», г. Тула, Россия

Никифоров В.С. — д.м.н., профессор, профессор кафедры функциональной диагностики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Logatkina A.V., Postgraduate Student, Department of Internal Medicine, Medical Institute, Tula State University, Tula, Russian Federation

Terekhov I.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General Pathology, Medical Institute, Tula State University, Tula, Russian Federation

Bondar S.S., Postgraduate Student, Department of Internal Medicine, Medical Institute, Tula State University, Tula, Russian Federation

Nikiforov V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Functional Diagnostics, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 24.06.2019
Отправлена на доработку 13.09.2019
Принята к печати 20.11.2019

Received 24.06.2019
Revision received 13.09.2019
Accepted 20.11.2019

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ IL-1 β (C511T), IL-17A (G197A), IL-12B (A1188C), TNF α (G308A) И IL-4 (C589T) ПРИ УГРОЗЕ РАННИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ

Татаркова Е.А.¹, Тугуз А.Р.², Цикуниб А.А.³, Шумилов Д.С.¹,
Смольков И.В.⁴, Руденко К.А.⁴, Муженя Д.В.⁴

¹ ГБОУ ДО Республики Адыгея «Республиканская естественно-математическая школа», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

² ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

³ ГБУЗ Республики Адыгея «Майкопская городская клиническая больница», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Резюме. Распространенность угрожающего выкидыша занимает 16-25 % от числа всех беременностей. Симптомокомплекс угрожающего выкидыша в I триместре может быть обусловлен трансформацией базовой воспалительной реакции, нарушающей межсистемные и локальные взаимодействия в эндометрии с последующей плацентарной недостаточностью, внутриутробным страданием плода и спонтанными абортами. Цель работы — исследование ассоциации SNPs (single nucleotide polymorphisms) генов цитокинов IL-1 β (C511T, rs16944), IL-17A (G197A, rs2275913), IL-12B (A1188C, rs3212227), TNF α (G308A, rs1800629) и IL-4 (C589T, rs2243250) с угрозой ранних репродуктивных потерь у жительниц Республики Адыгея (РА). Работа выполнена на базе иммуногенетической лаборатории Научно-исследовательского института комплексных проблем Адыгейского государственного университета. Аллельные варианты генов цитокинов выявлены SNP-методом в 106 образцах геномной ДНК женщин с угрозой прерывания беременности в I триместре (n = 58) и с неосложненной гестацией (n = 48). SNP-типирование полиморфных вариантов генов цитокинов IL-1 β , IL-17A, IL-12B, TNF α и IL-4 проведено методом ПЦР (полимеразной цепной реакции) с аллель-специфичными праймерами и электрофоретической детекцией результатов на тест-системах НПФ «Литех» (Москва). Статистический анализ экспериментальных данных проведен программе SPSS Statistica 17.0. Соответствие распределений SNP ожидаемым значениям при равновесии Харди–Вайнберга и сравнение частот аллельных вариантов/генотипов проводили с использованием критерия χ^2 (хи-квадрата с поправкой Йейтса), отношения шансов — OR (odds-ratation) при уровне значимости $p < 0,05$ и 95% доверительном интервале (95% CI). Достоверность различий частот изучаемых признаков для малых выборок оценивали с помощью точного критерия Фишера. С риском развития симптомокомплекса угрожающего выкидыша у жительниц Республики Адыгея достоверно ($p < 0,05$) ассоциированы гетеро- (C511T; OR = 3,46; 95% CI: 1,04-11,54) и гомозиготный «мутантный» (T511T; OR = 5,71; 95% CI: 1,12-29,09) генотипы основного провоспалительного IL-1 β . Аллели -511T гена IL-1 β и -1188C гена

Адрес для переписки:

Татаркова Елена Анатольевна
ГБОУ ДО Республики Адыгея «Республиканская
естественно-математическая школа»
385000, Россия, Республика Адыгея, г. Майкоп,
ул. Советская, 180.
Тел.: 8 (8772) 52-72-50.
Факс: 8 (8772) 52-79-82.
E-mail: lab_genetic@mail.ru

Address for correspondence:

Tatarkova Elena A.
Republican Natural-Mathematical School
125171, Russian Federation, Republic of Adygea, Maikop,
Sovetskaya str., 180.
Phone: 7 (8772) 52-72-50.
Fax: 7 (8772) 52-79-82.
E-mail: lab_genetic@mail.ru

Образец цитирования:

Е.А. Татаркова, А.Р. Тугуз, А.А. Цикуниб,
Д.С. Шумилов, И.В. Смольков, К.А. Руденко,
Д.В. Муженя «Полиморфизмы генов IL-1 β (C511T),
IL-17A (G197A), IL-12B (A1188C), TNF α (G308A)
и IL-4 (C589T) при угрозе ранних репродуктивных
потерь» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6.
С. 1179-1186. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1179-1186
© Татаркова Е.А. и соавт., 2019

For citation:

E.A. Tatarkova, A.R. Tuguz, A.A. Tsikunib, D.S. Shumilov,
I.V. Smolkov, K.A. Rudenko, D.V. Muzhenya "Gene
polymorphisms of IL-1 β (C511T), IL-17A (G197A), IL-12B
(A1188C), TNF α (G308A) and IL-4 (C589T) associated
with threat of early reproductive losses", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6,
pp. 1179-1186. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1179-1186
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1179-1186

IL-12B повышают риск раннего прерывания беременности, соответственно, в 5,8 (95% CI: 2,42-13,92; $p = 0,00004$) и 2,97 (95% CI: 1,23-7,19; $p = 0,01$) раза. В этнических группах русских ($p = 0,0001$; OR = 14,09) и адыгеек ($p = 0,02$; OR = 8,17) с риском развития симптомокомплекса угрожающего выкидыша ассоциирован «мутантный» -511T аллельный вариант гена IL-1 β , который практически не выявляется у женщин с нормальным течением беременности в первом триместре. Таким образом, из пяти типированных SNPs генов основных медиаторов иммунной системы у жительниц РА в качестве маркерных полиморфизмов гестационного неблагополучия могут быть использованы только C511T (rs16944) гена IL-1 β и A1188C (rs3212227) гена IL-12B.

Ключевые слова: угроза выкидыша, SNPs генов цитокинов, IL-17A (G197A, rs2275913), IL-1 β (C511T, rs16944), IL-4 (C589T, rs2243250), TNF α (G308A, rs1800629), IL-12B (A1188C, rs3212227)

GENE POLYMORPHISMS OF IL-1 β (C511T), IL-17A (G197A), IL-12B (A1188C), TNF α (G308A) AND IL-4 (C589T) ASSOCIATED WITH THREAT OF EARLY REPRODUCTIVE LOSSES

Tatarkova E.A.^a, Tuguz A.R.^b, Tsikunib A.A.^c, Shumilov D.S.^a, Smolkov I.V.^d, Rudenko K.A.^d, Muzhenya D.V.^d

^a Republican Natural-Mathematical School, Maikop, Adyghe Republic, Russian Federation

^b Adyghe State University, Maikop, Adyghe Republic, Russian Federation

^c Maikop City Clinical Hospital, Maikop, Adyghe Republic, Russian Federation

^d Maikop State Technological University, Maikop, Adyghe Republic, Russian Federation

Abstract. Prevalence of threatened miscarriage is 16-25% of all pregnancies. The symptomatics of the threatened miscarriage in the first trimester may develop due to conversion of initial inflammatory reaction that disturbs the intersystemic and local interactions in the endometrium, followed by placental insufficiency, intrauterine fetal affection and spontaneous abortion. The aim of our work was to study the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of some cytokine genes, e.g., IL-1 β (C511T, rs16944), IL-17A (G197A, rs2275913), IL-12B (A1188C, rs3212227), TNF α (G308A, rs1800629), and IL-4 (C589T, rs2243250) and the risk of early reproductive losses among residents of Adyghe Republic (RA). The work was carried out at the Immunogenetic Laboratory of our Research Institute of Complex Problems. The allelic variants of cytokine genes were detected by SNP-method in 106 samples of genomic DNA in women with the threatened abortion in 1st trimester ($n = 58$) and the uncomplicated gestation ($n = 48$). SNP-typing of polymorphic variants of cytokine genes IL-1 β , IL-17A, IL-12B, TNF α and IL-4 was carried out by PCR (polymerase chain reaction) with allele-specific primers and electrophoretic detection of results on test systems of (Litech, Moscow). Statistical analysis of experimental data was carried out by SPSS Statistical program 17.0. The correspondence of SNP distributions to expected values at Hardy-Weinberg equilibrium and comparison of allelic variants/genotypes frequencies were performed using the χ^2 criterion (Chi-square with Yates correction), odd ratios (OR) detected at significance level $p < 0.05$ and 95% confidence interval (95% CI). Reliability of the differences for the SNP frequencies for small samples was evaluated using the Fisher's exact criterion. Heterozygous variant (C511T; OR = 3.46; 95% CI: 1.04-11.54) and homozygous "mutant" genotypes (T511T; OR = 5.71; 95% CI: 1.12-29.09) of the main proinflammatory IL-1 β was significantly associated ($p < 0.05$) with the risk of developing threatening miscarriage in the Adyghe residents. The -511T allele of IL-1 β gene, and -1188C variant of IL-12B gene increase the risk of the early termination of pregnancy, respectively, 5.8-fold (95% CI: 2.42-13.92; $p = 0.00004$), and 2.97-fold (95% CI: 1.23-7.19; $p = 0.01$). The "mutant" -511T allelic variant of the IL-1 β gene is associated with the risk of developing a symptom complex of threatening miscarriage in Russian ethnic group ($p = 0.0001$; OR = 14.09), and in Adyghe ethnic group ($p = 0.02$; OR = 8.17), which is almost undetectable in women with normal pregnancy in the first trimester. Thus, only C511T (rs16944) in IL-1 β gene and A1188C (rs3212227) in IL-12B gene of the five typed cytokine genes may be used as marker polymorphisms of gestational distress for the women in Adyghe.

Keywords: threatened miscarriage, SNPs of cytokine genes, IL-17A (G197A, rs2275913), IL-1 β (C511T, rs16944), IL-4 (C589T, rs2243250), TNF α (G308A, rs1800629), IL-12B (A1188C, rs3212227)

Работа выполнена на базе иммуногенетической лаборатории Научно-исследовательского института комплексных проблем Адыгейского государственного университета.

Депопуляционные процессы в России и в мире связаны в основном с проблемой невынашивания беременности. Частота гравидарных потерь, по данным разных авторов, составляет от 2 до 55%, а в первом триместре достигает 75-85%. Распространенность угрожающего выкидыша занимает 16-25% от числа всех беременностей. Симптомокомплекс угрожающего выкидыша в I триместре может быть обусловлен трансформацией базовой воспалительной реакции, нарушающей межсистемные и локальные взаимодействия в эндометрии с последующей плацентарной недостаточностью, внутриутробным страданием плода и спонтанными абортами [3, 5].

При физиологическом течении беременности в фетоплацентарном комплексе сохраняется оптимальный баланс провоспалительных цитокинов, вырабатываемых Т-хелперами I типа (Th1): IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-12, IL-18, участвующих в клеточном иммунном ответе и продуцируемых Т-хелперами II типа (Th2) регуляторных цитокинов: IL-4, IL-5, IL-10, стимулирующих гуморальный иммунитет [10]. В соответствии с концепцией цитокинового сдвига, предложенной ранее Т. Вегманном (1993 г.) и поддерживаемой в настоящее время, иммунное обеспечение беременности сводится к регулируемому балансу Th1/Th2 материнского организма со снижением Th1- и повышением Th2-клеточной реактивности [2, 4, 5, 8, 9]. Полагают, что Th2 ингибируют пролиферацию и цитотоксическую активность NK, стимулирующих продукцию медиаторов Th2-типа по принципу положительных обратных связей [2, 15]. Это может иметь важное значение, так как провоспалительные цитокины, продуцируемые Th1, обладают прямым эмбриотоксическим эффектом, ограничивают инвазию и формирование трофобласта. Избыточные количества провоспалительных цитокинов активируют протромбиназу с нарушением в системе гемостаза, развитием тромбозов, инфарктов, отслойки трофобласта и ранних эмбриональных потерь. Сохранение беременности в этих условиях сопровождается первичной плацентарной недостаточностью [1, 2].

Несмотря на предположение о связи гестационных осложнений с превалированием Th1, в ряде исследований показано, что ранние этапы эмбриогенеза и имплантации при физиологическом течении беременности требуют усиленного Th1-иммунного ответа и формирования провоспалительного микроокружения в системе «мать – плацента – плод», необходимого для стимуляции васкулогенеза и успешной эмбриональной

имплантации. Это подтверждено *in vivo* на экспериментальных линиях мышей (INF γ -/-) [1, 4, 10].

Каждый этап протонированной во времени беременности характеризуется про-/противовоспалительным профилем, а более сложные по сравнению с аллотрансплантацией взаимодействия плода и материнского организма определяются медиаторами иммунной системы [4, 6]. Цитокины контролируют этапы имплантации зародыша, пролиферации, роста и созревания плаценты, органогенез плода. Уровни продукции цитокинов регулируются различными механизмами, одним из которых являются полиморфизмы генов, расположенные в промоторных регионах и ассоциированные с гиперэкспрессией соответствующих медиаторов воспаления «первой волны». [3]. SNPs генов цитокинов могут определять баланс/дисбаланс про- и противовоспалительных медиаторов, нарушая ранние этапы эмбрионального развития. Связь между аллельными вариантами генов цитокинов и риском нарушения взаимодействий в системе «мать – плацента – плод» обсуждается, однако данные весьма противоречивы и преимущественно акцентированы на привычном невынашивании беременности [4, 7, 9, 11, 14].

Спектр исследованных SNP генов медиаторов воспаления, ассоциированных с ранними репродуктивными осложнениями: IL-1 β (C511T, rs16944), IL-17A (G197A, rs2275913), IL-12B (A1188C, rs3212227), TNF α (G308A, rs1800629) и IL-4 (C589T, rs2243250) определен при анализе международных баз данных (МБД) National Center for Biotechnology Information (NCBI), Springer, ScienceDirect, Science Research Portal, Google Scholar, КиберЛенинка, HuGe Navigator. Полиморфизмы промоторных регионов генов цитокинов, влияющие на уровни их экспрессии, имеют выраженную этническую специфику, однако в информационных системах данные по ассоциации с угрозой выкидыша до 13 недели гестации немногочисленны, а по Республике Адыгея (РА) практически не представлены, что и определило цель настоящего исследования.

Цель работы – исследовать распределение частот аллельных вариантов, генотипов и ассоциацию SNPs генов цитокинов IL-1 β (C511T, rs16944), IL-17A (G197A, rs2275913), IL-12B (A1188C, rs3212227), TNF α (G308A, rs1800629) и IL-4 (C589T, rs2243250) с угрозой ранних репродуктивных потерь у жительниц РА.

В соответствии с принципами Хельсинкской декларации (1964 г., доп. 2013 г.) исследование проведено с письменного информированного согласия 106 неродственных женщин славянской и адыгской национальности репродуктивного возраста, подобранных эмпирически и распределенных по двум группам в зависимости от течения гестации и акушерскому анамнезу. Критерии исключения: женщины с тяжелой соматической

патологией, хроническими заболеваниями в стадии декомпенсации (заболеваниями печени, почек, эндокринных желез, сердечно-сосудистой системы с нарушением их функций), прервавшимися беременностями в результате хромосомных аномалий и врожденными пороками развития плода.

В первую группу (n = 58) включены пациентки 19-45 лет (28,5±5,7 лет) акушерского отделения № 2 патологии малых сроков беременности ГБУЗ РА «Майкопская городская клиническая боль-

ница» с верифицированным диагнозом угрозы прерывания беременности на момент исследования в срок до 13 недель, с использованием клинических методов исследования и лабораторных показателей. В анамнезе обследованных женщин – ранние репродуктивные потери по типу неразвивающейся беременности или самопроизвольного аборта. Контрольная (вторая группа, n = 48) представлена здоровыми жительницами РА 18-45 лет (28,8±5,1 лет), имеющими одного и более здоровых детей, без отягощенности

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ IL-1 β , IL-17A, IL-12B, TNF α И IL-4 ПРИ УГРОЗЕ РАННИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ У ЖИТЕЛЬНИЦ РА

TABLE 1. FREQUENCY DISTRIBUTION OF GENOTYPES AND ALLELES OF IL-1 β , IL-17A, IL-12B, TNF α AND IL-4 GENES WITH THE THREAT OF EARLY REPRODUCTIVE LOSSES IN WOMEN OF ADYGHE REPUBLIC

Полиморфный вариант Polymorphic variant	Генотипы/Аллели Genotypes/ Alleles	Угроза прерывания беременности Threatened miscarriage n = 31 ¹ ; 58 ² ; 42 ³ ; 31 ⁴ ; 31 ⁵	Физиологическая беременность Physiological pregnancy n = 26 ¹ ; 48 ² ; 42 ³ ; 26 ⁴ ; 26 ⁵	χ^2	P	OR	95% CI
IL-1 β C511T ¹	C511C	0,226	0,731	14,81	0,0006*	0,11	0,03-0,36
	C511T	0,452	0,192			3,46	1,04-11,54
	T511T	0,323	0,077			5,71	1,12-29,09
	C511	0,452	0,827	16,96	0,00004*	0,17	0,07-0,41
	511T	0,548	0,173			5,80	2,42-13,92
IL-17A G197A ²	G197G	0,414	0,458	0,57	0,75	0,83	0,39-1,80
	G197A	0,362	0,375			0,95	0,43-2,09
	A197A	0,224	0,167			1,44	0,54-3,84
	G197	0,595	0,646	0,58	0,45	0,81	0,46-1,41
	197A	0,405e	0,354			1,24	0,71-2,17
IL-12B A1188C ³	A1188A	0,643	0,857	5,14	0,08	0,30	0,10-0,87
	A1188C	0,238	0,095			2,97	0,85-10,38
	C1188C	0,119	0,048			2,70	0,49-14,79
	A1188	0,762	0,905	6,17	0,01*	0,34	0,14-0,82
	1188C	0,238	0,095			2,97	1,23-7,19
TNF α G308A ⁴	G308G	0,419	0,423	2,84	0,24	0,98	0,34-2,83
	G308A	0,548	0,423			1,66	0,58-4,74
	A308A	0,032	0,154			0,18	0,02-1,76
	G308	0,694	0,635	0,44	0,51	1,30	0,60-2,85
	308A	0,306	0,365			0,77	0,35-1,68
IL-4 C589T ⁵	C589C	0,581	0,654	1,03	0,6	0,73	0,25-2,15
	C589T	0,387	0,346			1,19	0,40-3,53
	T589T	0,032	0,000			2,61	0,10-66,74
	C589	0,774	0,827	0,49	0,48	0,72	0,28-1,82
	589T	0,226	0,173			1,39	0,55-3,54

Примечание. * – достоверность различий при $p \leq 0,05$; $\chi^2 > 3,6$.

Note. *, reliability of differences at $p \leq 0.05$; $\chi^2 > 3.6$.

по исследуемой нозологии, с отсутствием в анамнезе медицинских аборт, внематочной беременности и маточных анатомических аномалий.

Материалы и методы

Образцы ДНК обследованных групп женщин выделены с использованием тест-систем «Проба ГС-Генетика» (ООО «ДНК-Технология», Москва) согласно инструкции производителя и последующим определением чистоты образцов и концентрации ДНК на спектрофотометре NanoDrop 2000с (Thermo Scientific, США). Для SNP-типирования полиморфных вариантов генов цитокинов IL-1 β , IL-17A, IL-12B, TNF α и IL-4 использован метод ПЦР с аллель-специфичными праймерами и электрофоретической детекцией результатов на тест-системах НПФ «Литех» (Москва). Сравнительная статистическая обработка экспериментальных данных проведена в программе SPSS Statistica 17.0. Соответствие распределений SNP ожидаемым значениям при равновесии Харди–Вайнберга и сравнение частот аллельных вариантов/генотипов проводили с использованием критерия χ^2 (хи-квадрата и поправкой Йейтса), отношения шансов – OR (odds-ratio) при уровне значимости $p < 0,05$ и 95% доверительном интервале (95% CI). Достоверность различий частот изучаемых признаков для малых выборок оценивали с помощью точного критерия Фишера.

Результаты и обсуждение

Аллельные варианты генов цитокинов могут обуславливать гиперэкспрессию провоспалительных цитокинов и дисбаланс медиаторов иммунной системы, что определяет генетическую предрасположенность к нарушению фетоплацентарных взаимодействий и ранним репродуктивным потерям [1, 4]. Восприимчивость к некоторым инфекционным, воспалительным и аутоиммунным заболеваниям у беременных женщин повышает риск гестационных осложнений и во многом зависит от SNP в промоторах регионах генов, влияющих на связывание факторов транскрипции и гиперпродукцию соответствующих медиаторов [10, 14, 15]. Исследование ассоциации полиморфизмов генов с уровнями продукции цитокинов является актуальным направлением в обосновании роли воспалительного компонента в процессах развития беременности и иммунного ответа материнского организма на развивающийся плод [4, 6].

Поэтому, в соответствии с поставленной целью, в образцах геномной ДНК беременных жительниц Республики Адыгея проанализировано распределение частот генотипов и аллелей генов основных цитокинов IL-1 β (C511T, rs16944), IL-17A (G197A, rs2275913), IL-12B (A1188C, rs3212227), TNF α (G308A, rs1800629) и IL-4 (C589T, rs2243250) (табл. 1).

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ SNPs ГЕНОВ IL-1 β , IL-17A, IL-12B, TNF α И IL-4 ПРИ УГРОЗЕ РАННЕГО ВЫКИДЫША В ГРУППЕ РУССКИХ ЖИТЕЛЬНИЦ РЕСПУБЛИКИ АДЫГЕЯ

TABLE 2. DISTRIBUTION OF SNPs OF THE GENES IL-1 β , IL-17A, IL-12B, TNF α AND IL-4 WITH THE THREAT OF EARLY MISCARRIAGE IN THE GROUP OF THE RUSSIAN WOMEN OF ADYGHE REPUBLIC

Полиморфный вариант Polymorphic variant	Аллели Alleles	Угроза прерывания беременности Threatened miscarriage	Физиологическая беременность Physiological pregnancy	P	OR	95% CI
		n = 25 ¹ ; 35 ² ; 24 ³ ; 25 ⁴ ; 25 ⁵	n = 13 ¹ ; 29 ² ; 23 ³ ; 13 ⁴ ; 13 ⁵			
IL-1 β C511T ¹	C511	0,460	0,923	0,00005*	0,07	0,02-0,33
	511T	0,540	0,077		14,09	3,00-66,11
IL-17A G197A ²	G197	0,686	0,638	0,58	1,24	0,59-2,58
	197A	0,314	0,362		0,81	0,39-1,69
IL-12B A1188C ³	A1188	0,792	0,935	0,07	0,27	0,07-1,04
	1188C	0,208	0,065		3,77	0,97-14,73
TNF α G308A ⁴	G308	0,660	0,731	0,61	0,72	0,25-2,03
	308A	0,340	0,269		1,40	0,49-3,98
IL-4 C589T ⁵	C589	0,760	0,731	1,0	1,17	0,40-3,44
	589T	0,240	0,269		0,86	0,29-2,53

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ IL-1 β , IL-17A, IL-12B, TNF α И IL-4 ПРИ УГРОЗЕ ВЫКИДЫША НА РАННИХ СРОКАХ В ГРУППЕ ЖЕНЩИН-АДЫГЕЕК

TABLE 3. FREQUENCY OF GENOTYPES AND ALLELES OF THE GENES IL-1 β , IL-17A, IL-12B, TNF α AND IL-4 WITH THE THREAT OF MISCARRIAGE AT EARLY TERMS IN THE GROUP OF THE ADYGHE WOMEN

Полиморфный вариант Polymorphic variant	Аллели Alleles	Угроза прерывания беременности Threatened miscarriage	Физиологическая беременность Physiological pregnancy	P	OR	95% CI
		n = 6 ¹ ; 18 ² ; 15 ³ ; 6 ⁴ ; 25 ⁵	n = 9 ¹ ; 14 ² ; 13 ³ ; 9 ⁴ ; 13 ⁵			
IL-1 β C511T ¹	C511	0,300	0,778	0,02*	0,12	0,02-0,70
	511T	0,700	0,222		8,17	1,42-47,02
IL-17A G197A ²	G197	0,556	0,679	0,44	0,59	0,21-1,66
	197A	0,444	0,321		1,69	0,60-4,73
IL-12B A1188C ³	A1188	0,667	0,885	0,07	0,26	0,06-1,08
	1188C	0,333	0,115		3,83	0,92-15,90
TNF α G308A ⁴	G308	0,900	0,556	0,1	7,20	0,75-69,38
	308A	0,100	0,444		0,14	0,01-1,34
IL-4 C589T ⁵	C589	0,900	0,944	1,0	0,53	0,03-9,50
	589T	0,100	0,056		1,89	0,11-33,89

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

У жительниц Республики Адыгея из пяти исследованных SNP генов цитокинов с угрозой раннего прерывания беременности ассоциированы «мутантный» -511T аллель ($\chi^2 = 16,96$; OR = 5,8; p = 0,00004), гетерозиготный C511T и гомозиготный T511T генотипы гена медиатора острого воспаления IL-1 β , повышающие риск самопроизвольного аборта, соответственно, в 3,5 и 5,7 раза ($\chi^2 = 14,81$; p = 0,0006) в первом триместре, а также -1188C аллельный вариант гена регуляторного IL-12B ($\chi^2 = 6,17$; OR = 2,97; p = 0,01) (табл. 1). Следует отметить, что в масштабных метаанализах получены весьма противоречивые данные об ассоциации C511T полиморфизма гена IL-1 β с патологией беременности. Так, при генотипировании 775 женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) и 805 здоровых жительниц (Китай) показано, что гомозиготный C511C генотип гена IL-1 β достоверно повышает риск рецидива выкидыша (OR = 1,377; 95% CI: 1,039-1,824; p = 0,026) [10]. В исследовании (n = 9401), проведенном Zhang M. и соавт. в 2017 году, также подтверждена роль IL-1 β (C511T) в развитии привычного невынашивания беременности [15]. Тем не менее в метаанализах Bombell S. и соавт. (2008 г.) и Ma X. (2012 г.) не выявлено достоверной ассоциации C511/511T аллельных вариантов гена IL-1 β с рецидивирующими выкидышами [7, 11]. Одной из причин противоречивых данных, полученных для жителей Китая, может быть сравнение разных этнических групп,

проживающих в географически удаленных провинциях, проведение исследования без учета связи IL-1 β с другими медиаторами. Например, IL-1 β в сочетании с повышенным децидуальным уровнем IL-12 направляет дифференцировку Th0 по Th1-типу, что может сказываться на течении гестации и способствовать раннему прерыванию беременности [14].

Перспективно типирование SNP в гене IL-12B, так как он является ключевым медиатором развития Th1, влияет на иммунные клеточные реакции, регулируя активность макрофагов и цитотоксичность НК при формировании сосудистой системы матки. Несмотря на отсутствие достоверной информации в МБД (NCBI, Springer, ScienceDirect, Science Research Portal, Google Scholar, КиберЛенинка, HuGe Navigator) о связи A1188C (rs3212227) полиморфизма гена IL-12B с угрозой прерывания беременности на ранних сроках, в общей группе обследованных женщин РА установлена строгая ассоциация (OR = 2,97; 95% CI: 1,23-7,19; p = 0,01) A1188C полиморфного варианта гена IL-12B с ранними репродуктивными потерями (табл. 1-3). Следует отметить, что в зарубежных и отечественных работах аналогичные заключения о роли A1188C гена IL-12B в самопроизвольном прерывании беременности не представлены, а для жителей Китая и Хорватии показано отсутствие связи rs3212227 SNP с тяжелыми гестационными осложнениями (не-

вынашиванием беременности, преэклампсией и т.д.) [13].

Исследования генетического компонента популяции позволяют определить иммуногенетический профиль и установить специфические особенности представителей разных этнических групп, так как по многим полиморфным сайтам генов цитокинов выявлены межпопуляционные различия [6, 15]. Результаты анализа частотного распределения аллельных вариантов генов в группах русских женщин и этнических адыгеек представлены в таблицах 2, 3.

У этнических русских женщин и женщин адыгеек с риском развития симптомокомплекса угрожающего выкидыша ассоциирован «мутантный» -511T аллель гена IL-1 β (соответственно, OR = 14,09; $p = 0,00005$ и OR = 8,17; $p = 0,02$), который чаще выявляется среди данного контингента и практически не обнаруживается у женщин с нормальным течением беременности. По A1188/1188C полиморфизмам гена IL-12B различия между группами русских женщин с нормальным течением гестации и угрозой раннего выкидыша приближаются к статистически значимым ($p = 0,07$). Для остальных генов-кандидатов (IL-17A, TNF α , IL-4) ассоциация не установлена (табл. 2).

Результаты экспериментальных исследований (табл. 1-3) подтверждают выводы Kim J.O. и соавт. (2014 г.) о повышении частоты «мутантного» для азиатской популяции аллельного варианта -511C гена IL-1 β у женщин с привычным невынашиванием беременности ($p \leq 0,05$), независимо от их этнической принадлежности. Это обусловлено тем, что C511T (rs16944) полиморфизм, расположенный в промоторном регионе гена IL-1 β , сопряжен с гиперэкспрессией медиатора и повышением пула NK-клеток в популяции лимфоцитов [15] и, возможно, вовлечен в патогенез самопроизвольного прерывания беременности. Механизм прямого повреждающего эффекта IL-1 β малоизучен, однако возможно опосредованное участие IL-1 β в развитии клеточного ответа с экспрессией генов около 100 цитокинов,

гормонов, ферментов, ростовых факторов, других биологически активных веществ и их рецепторов [3, 4, 14, 15].

Медиатор острого и хронического воспаления IL-17A, синтезируемый в основном Th17, накапливается в периферической крови, децидуальной оболочке плода, запускает патофизиологические процессы привычного невынашивания беременности, что показано для египтянок. G197A (rs2275913) полиморфизм у них ассоциирован с повышенным уровнем сывороточного уровня IL-17A и, соответственно, с риском ПНБ [8, 12, 15]. Тем не менее при привычном невынашивании беременности в иранской популяции G197A полиморфизм гена IL-17 неинформативен [12]. Полиморфизмы гена ключевого медиатора иммунного воспаления фактора некроза опухоли-альфа ассоциированы с рецидивирующими выкидышами у жительниц Северной Индии (-308A аллель и гомозиготный «мутантный» генотип A308A гена TNF α ; $p < 0,05$) и служат маркером предрасположенности к спонтанным абортam у женщин Ростовской области, но не информативны при неразвивающейся беременности [4].

В серии работ на больших выборках иранских и китайских женщин не подтверждена связь -308A аллеля TNF α с рецидивирующей потерей беременности. Отсутствие строгой ассоциации точечных мутаций G308A (rs1800629) гена TNF α и C589T (или C590T; rs2243250) гена IL-4 с самопроизвольным прерыванием беременности подтверждено зарубежными учеными [7, 9, 10] и настоящим экспериментальным исследованием (табл. 1-3), проведенным на базе иммуногенетической лаборатории НИИ комплексных проблем АГУ.

Таким образом, у жительниц РА из типированных SNP генов основных медиаторов иммунной системы только C511T гена IL-1 β и A1188C гена IL-12B могут быть использованы в качестве маркерных полиморфизмов гестационного неблагополучия.

Список литературы / References

1. Газиева И.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И. Роль нарушений продукции цитокинов в генезе плацентарной недостаточности и ранних репродуктивных потерь // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 6. С. 539-550. [Gazieva I.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I. The role of cytokine production disorders in the genesis of placental insufficiency and early reproductive losses. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 6, pp. 539-550. (In Russ.)] doi.org/10.15789/1563-0625-2014-6-539-550.
2. Лаптина Т.А. Иммуногенетика и репродукция человека. Ростов н/Д, 2013. 79 с. [Laptina T.A. Immunogenetics and human reproduction]. Rostov-on-Don, 2013. 79 p.
3. Лигидова А.Т., Друккер Н.А., Крымшохалова З.С. Роль нарушенной продукции цитокинов в патогенезе угрозы прерывания беременности в I триместре // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки, 2011. № 4. С. 212-215. [Ligidova A.T., Drukker N.A., Krymshokhalova Z.S. The role of impaired cytokine production in the pathogenesis of threatened abortion in the first trimester. *Izvestiya vuzov. Severo-Kavkazskiy region. Estestvennye nauki = News of Universities. North Caucasus Region. Natural Sciences*, 2011, no. 4, pp. 212-215. (In Russ.)]
4. Машкина Е.В., Коваленко К.А., Фомина Н.В., Шкурят Т.П. Исследование ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов с ранними эмбриональными потерями // Экологическая генетика человека,

2014, Т. 12, № 1. С. 19-27. [Mashkina E.V., Kovalenko K.A., Fomina N.V., Shkurat T.P. Study on the association of polymorphic variants of cytokine genes with early embryonic losses. *Ekologicheskaya genetika cheloveka = Ecological Human Genetics*, 2014, Vol. 12, no. 1, pp. 19-27. (In Russ.)]

5. Сахаутдинова И.В., Ложкина Л.Р. Иммуномодулирующая роль прогестерона в терапии угрозы прерывания беременности // Медицинский вестник Башкортостана, 2014. Т. 9, № 4. С. 96-99. [Sakhautdinova I.V., Lozhkina L.R. Immunomodulatory role of progesterone in the treatment of threatened abortion. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Medical Bulletin of Bashkortostan*, 2014, Vol. 9, no. 4, pp. 96-99. (In Russ.)]

6. Сташкевич Д.С. Актуальные вопросы иммунологии: система цитокинов, биологическое значение, генетический полиморфизм, методы определения. Челябинск: Цицеро, 2016. 82 с. [Stashkevich D.S. Topical issues of immunology: cytokine system, biological significance, genetic polymorphism, methods of determination]. Chelyabinsk: Cicero, 2016. 82 p.

7. Bombell S., McGuire W. Cytokine polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss: meta-analysis. *Aust NZJ Obstet. Gynaecol.*, 2008, Vol. 48, pp. 147-154.

8. Cai Y., Li M.-J. Interleukin 23 regulates the functions of human decidual immune cells during early pregnancy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016, Vol. 469, no. 3, pp. 340-344.

9. Kamali-Sarvestani E., Zolghadri J., Ghareh-Fard B., Sarvari J. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. *J. Reprod. Immunol.*, 2005, Vol. 65, no. 2, pp. 171-178.

10. Ma J., Zhang X., He G., Yang Ch. Association between TNF, IL1B, IL6, IL10 and IFNG polymorphisms and recurrent miscarriage: a case control study. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2017, Vol. 15, no. 1, p. 83.

11. Ma X., Xu L.J., Wang J., Xian M.M., Liu M. Association of IL-1 β and IL-6 gene polymorphisms with recurrent spontaneous abortion in a Chinese Han population. *Int. J. Immunogenet.*, 2012, Vol. 39, no. 1, pp. 15-19.

12. Najafi S., Hadinedoushan H., Eslami G., Aflatoonian A. Association of IL-17A and IL-17 F gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Iranian women. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2014, Vol. 31, no. 11, pp. 1491-1496.

13. Wang X., Guo M., Li S., Gong J., Song W., Wang H., Liu S. The role of the IL-12 polymorphism rs3212227 in preeclampsia in Chinese Han Women. *Clin. Exp. Hypertens.*, 2016, Vol. 38, no. 4, pp. 388-392.

14. Wang Z.C., Yunis E.J., de los Santos M.J., Xiao L., Anderson D.J., Hill J.A. T helper 1-type immunity to trophoblast antigens in women with a history of recurrent pregnancy loss is associated with polymorphism of the IL1B promoter region. *Genes Immun.*, 2002, Vol. 3, pp. 38-42.

15. Zhang M., Xu J., Bao X., Niu W., Wang L., Du L., Zhang N., Sun Y. Association between genetic polymorphisms in interleukin genes and recurrent pregnancy loss – a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 1, e0169891. doi: 10.1371/journal.pone.0169891.

Авторы:

Татаркова Е.А. — преподаватель ГБОУ ДО Республики Адыгея «Республиканская естественно-математическая школа», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Тугуз А.Р. — д.б.н., профессор, заведующая иммуногенетической лабораторией Научно-исследовательского института комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Цикун А.А. — врач акушер-гинеколог, заведующая акушерским отделением патологии беременности № 2 (малых сроков) ГБУЗ Республики Адыгея «Майкопская городская клиническая больница», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Шумилов Д.С. — к.б.н., преподаватель ГБОУ ДО Республики Адыгея «Республиканская естественно-математическая школа», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Смолков И.В. — к.б.н., старший преподаватель ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Руденко К.А. — к.б.н., доцент ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Муженя Д.В. — к.б.н., доцент ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Authors:

Tatarkova E.A., Lecturer, Republican Natural-Mathematical School, Maikop, Adyghe Republic, Russian Federation

Tuguz A.R., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Immunogenetic Laboratory, Research Institute of Complex Problems, Adyghe State University, Maikop, Adyghe Republic, Russian Federation

Tsikun A.A., Clinical Obstetrician/Gynecologist, Head, Department of Pathology in Pregnancy No. 2 (small terms), Maikop City Clinical Hospital, Maikop, Adyghe Republic, Russian Federation

Shumilov D.S., PhD (Biology), Lecturer, Republican Natural-Mathematical School, Maikop, Adyghe Republic, Russian Federation

Smolkov I.V., PhD (Biology), Senior Lecturer, Maikop State Technological University, Maikop, Adyghe Republic, Russian Federation

Rudenko K.A., PhD (Biology), Associate Professor, Maikop State Technological University, Maikop, Adyghe Republic, Russian Federation

Muzhenya D.V., PhD (Biology), Associate Professor, Maikop State Technological University, Maikop, Adyghe Republic, Russian Federation

Поступила 12.05.2019
Принята к печати 24.05.2019

Received 12.05.2019
Accepted 24.05.2019

КОМПОЗИЦИЯ ТРЕХ МУРАМИЛПЕПТИДОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В ИММУНОТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПИОДЕРМИИ

Калюжин О.В.¹, Летяева О.И.^{2,3}, Зиганшин О.Р.², Маркеева Д.А.³,
Блохина Ю.В.⁴, Феденко Е.С.⁵, Попилук С.Ф.⁶

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

³ Многопрофильная профессорская клиника «СитиМед» центра ООО «Экология здоровья», г. Челябинск, Россия

⁴ ГБУЗ «Челябинский областной клинический кожно-венерологический диспансер», г. Челябинск, Россия

⁵ ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» ФМБА России, Москва, Россия

⁶ ООО «Корус-Фарма» — резидент кластера «Биомедицинские технологии» фонда «Сколково», Москва, Россия

Резюме. Цель работы — оценить клиническую эффективность стандартизированной композиции трех мурамилпептидов, содержащих остаток мезо-диаминопимелиновой кислоты (Полимурамил), и влияние этого иммуномодулятора на субпопуляционный состав лимфоцитов, функцию циркулирующих нейтрофилов и концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови у больных с хронической рецидивирующей пиодермией. 35 мужчин (34,5±10 лет) с обострением хронической пиодермии (остеофолликулит, фолликулит, сикоз, фурункулез) рандомизировали в две группы, сопоставимые по возрасту и клиническим проявлениям болезни. В группе сравнения (n = 17) пациенты получали стандартное лечение, в основной группе (n = 18), кроме того, — Полимурамил внутримышечно по 200 мг ежедневно с 1-го по 5-й день исследования. Общую оценку клинической эффективности лечения проводили на 14-й день, через 1 и 6 месяцев. При этом «значительным улучшением» считали индукцию и сохранение полной клинической ремиссии; «улучшением» — индукцию и сохранение частичной ремиссии; «отсутствием эффекта» — сохраняющиеся признаки воспалительного процесса и отсутствие ремиссии. Иммунологические показатели исследовали на 0-й и 14-й дни, через 1 и 6 месяцев. Добавление Полимурамила к стандартному лечению вызывало выраженную тенденцию к увеличению доли больных со «значительным улучшением» или «улучшением» на 14-й день исследования: суммарная доля пациентов с любым клиническим улучшением была на 24% выше, а относительное число больных с «отсутствием эффекта» — в пять раз ниже, чем в группе сравнения (p = 0,076). Тренд по повышению клинической эффективности по указанным критериям сохранялся через 1 и 6 месяцев наблюдения. Через полгода доля пациентов без пустул/фурункулов в основной группе (9 из 18) превышала таковую в группе сравнения (3 из 17) (p = 0,047). Существенных межгрупповых отличий и динамики показателей функции нейтрофилов, субпопуляционного состава лимфоцитов и концентраций иммуноглобулинов в сыворотке крови не выявлено. Вместе с тем в основной группе через 6 месяцев отмечали тренд к повышению абсолютного числа Т-клеток за счет CD3⁺CD4⁺ субпопуляции, а также концентрации IgA в сыворотке крови. Результаты работы в совокупности с ра-

Адрес для переписки:

Калюжин Олег Витальевич
ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ
119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2.
Тел.: 8 (916) 604-58-50.
Факс: 8 (499) 248-01-81.
E-mail: kalyuzhin@list.ru

Address for correspondence:

Kalyuzhin Oleg V.
First Moscow State I. Sechenov Medical University
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya str., 8,
bldg 2.
Phone: 7 (916) 604-58-50.
Fax: 7 (499) 248-01-81.
E-mail: kalyuzhin@list.ru

Образец цитирования:

О.В. Калюжин, О.И. Летяева, О.Р. Зиганшин,
Д.А. Маркеева, Ю.В. Блохина, Е.С. Феденко,
С.Ф. Попилук «Композиция трех мурамилпептидов
грамотрицательных бактерий в иммунотерапии
хронической пиодермии» // Медицинская иммунология,
2019. Т. 21, № 6. С. 1187-1196.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1187-1196
© Калюжин О.В. и соавт., 2019

For citation:

O.V. Kalyuzhin, O.I. Letyaeva, O.R. Ziganshin,
D.A. Markeeva, Yu.V. Blokhina, E.S. Fedenko, S.F. Popilyuk
“A combination of three muramyl peptides derived from gram-
negative bacteria in immunotherapy of chronic pyoderma”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1187-1196.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1187-1196
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1187-1196

нее опубликованными данными свидетельствуют о способности Полимурамила ускорять регрессию клинических проявлений и индуцировать стойкую ремиссию хронической пиодермии. При этом дизайн настоящего исследования и сроки взятия биологических образцов для лабораторных исследований не позволили зарегистрировать существенные сдвиги большинства изученных системных иммунологических показателей под влиянием иммуномодулятора, за исключением ранее описанной модуляции уровня про- и противовоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: хроническая пиодермия, инфекция кожи, мурамилпептиды, мезо-диаминопимелиновая кислота, иммуномодулятор, клиническая эффективность, функция нейтрофилов, субпопуляции лимфоцитов, иммуноглобулины

A COMBINATION OF THREE MURAMYL PEPTIDES DERIVED FROM GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN IMMUNOTHERAPY OF CHRONIC PYODERMIA

Kalyuzhin O.V.^a, Letyaeva O.I.^{b,c}, Ziganshin O.R.^b, Markeeva D.A.^c, Blokhina Yu.V.^d, Fedenko E.S.^e, Popilyuk S.F.^f

^a First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^b South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

^c Multi-profile Professorial Clinic CityMed, "Ecology of Health" Center, Chelyabinsk, Russian Federation

^d Chelyabinsk Regional Clinical Dermato-venereal Dispensary, Chelyabinsk, Russian Federation

^e National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

^f Corus-Pharma Ltd – Resident of Skolkovo Foundation, Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim of the present study was to evaluate the clinical efficacy of a standardized combination of three muramyl peptides containing a residue of meso-diaminopimelic acid (Polymuramyl), as well as effects of this immunomodulator on the lymphocyte subpopulation profile, function of circulating neutrophils, and concentrations of serum immunoglobulins in the patients with chronic recurrent pyoderma. Thirty-five men (34.5 ± 10 years) with exacerbation of chronic pyoderma (osteofolliculitis, folliculitis, sycosis, furunculosis) were randomized into two groups matched by age and clinical manifestations of the disease. In the comparison group ($n = 17$), the patients received standard treatment. In the main group ($n = 18$), in addition to the same standard treatment, the patients received intramuscular injections of Polymuramyl at a dose of 200 mg daily from day 1 to 5 of the study. The overall assessment of the treatment efficacy was performed on the day 14, and at 1 and 6 months of observations. Induction and maintenance of complete clinical remission were assessed as "significant improvement"; induction and maintenance of partial remission were considered to be "improvement"; persistent signs of skin inflammation and lack of remission were assessed as "lack of effect". Immunological parameters were studied on days 0 and 14, and then at 1 and 6 months of the study. Addition of Polymuramyl to the standard treatment caused a marked tendency towards increased proportion of the patients with «significant improvement» or «improvement» on the day 14: total ratio of the patients with any clinical improvement was 24% higher, and the relative number of the patients with "lack of effect" was five-fold lower than in the comparison group ($p=0.076$). A trend towards improved clinical efficacy, according to the above criteria, was maintained after 1 and 6 months of the study. At 6 months of the follow-up, the proportion of patients without pustules/furuncles in the main group (9 out of 18) exceeded that in the comparison group (3/17, $p = 0.047$). Significant inter-group differences and dynamics of indicators of neutrophil functions, subpopulation composition of lymphocytes and concentrations of immunoglobulins in serum were not detected. However, in the main group after the 6-month observation, there was an upward trend in the absolute number of T-cells due to $CD3^+CD4^+$ subpopulation, as well as serum IgA concentration. The results of this study are in accordance with previously published data, thus indicating the ability of Polymuramyl to accelerate regression of clinical manifestations of chronic pyoderma and induce sustained remission of this disease. At the same time, the design of present investigation and the timing of taking biological samples for laboratory tests did not allow to register significant changes in most of the studied systemic immunological parameters under the influence of immunomodulator, except for the previously described modulation at the level of pro- and anti-inflammatory cytokines.

Keywords: chronic pyoderma, skin infection, muramyl peptides, meso-diaminopimelic acid, immunomodulator, clinical efficacy, function of neutrophils, lymphocyte subpopulations, immunoglobulins

Введение

Пиодермии — зонтичный термин, объединяющий различающиеся по глубине поражения и клиническим проявлениям гнойно-воспалительные болезни кожи, течение которых зависит, с одной стороны, от свойств инфекционных агентов, с другой — от адекватности/эффективности иммунного ответа зараженного макроорганизма. Наиболее часто в качестве возбудителей пиодермии выступают представители родов *Staphylococcus* (*S. aureus*, реже — *S. epidermidis*) и *Streptococcus* (*S. pyogenes*). Эти бактерии привлекают к себе внимание не только как причина разнообразных, в том числе инвазивных, инфекционных болезней, но и как микроорганизмы, которые способны индуцировать и/или потенцировать дефекты различных звеньев противинфекционной защиты. По многим направлениям выигрывая эволюционную гонку вооружений с совершенствующейся системой защитных реакций хозяина, стафилококки и стрептококки научились уклоняться как от адаптивных, так и от врожденных иммунных механизмов [17]. *S. aureus* индуцирует целый ряд биохимических каскадов, в частности связанных с продукцией стафопаина В, вызывающих быструю апоптозоподобную гибель моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов [20]. *S. pyogenes* блокирует слияние фагосом с лизосомами в макрофагах, превращая эти клетки в резервуар для выживания и плацдарм для заражения новых клеток [13]. Кроме того, представители родов *Staphylococcus* и *Streptococcus* манипулируют естественными механизмами иммунодемпфирования (то есть подавления избыточных иммунных реакций), связывая рецепторы с внутриклеточным ингибирующим мотивом ITIM и тем самым угнетая врожденные защитные механизмы макроорганизма [21]. Ключевыми чертами указанных бактерий является способность длительно колонизировать различные биотопы организма хозяина и вызывать рецидивирующие инфекции кожи и мягких тканей, не приводящие к формированию эффективной иммунной памяти и устойчивости к повторным заболеваниям.

В этой связи не вызывает сомнений востребованность иммуномодуляции как составной части комплексного лечения больных хроническими формами пиодермии, что актуализируют рациональный выбор эффективных средств восстановления антибактериальной защиты в коже и подкожной клетчатке.

В последнее 10-15 лет достаточно много работ было посвящено изучению роли цитозольных NOD-подобных рецепторов во врожденном иммунном ответе [16], а модуляция NOD1- и NOD2-зависимых сигналов рассматривается как одна

из перспективных стратегий в лечении целого ряда инфекционных заболеваний человека [3, 8]. NOD1 и NOD2 экспрессируются многими клетками, локализующимися в коже и подкожной клетчатке, в том числе моноцитами/макрофагами и дендритными клетками [10]. Кератиноциты человека, являющиеся ключевыми клетками врожденного иммунного ответа против *S. aureus* в коже [7], также экспрессируют NOD1 [12] и NOD2 [14].

Нейтрофилы человека экспрессируют NOD2, но не NOD1 [11]. Вместе с тем NOD1-агонисты, индуцируя выработку хемокинов, опосредованно мобилизуют нейтрофилы в зоны бактериальной инвазии [15].

Доказано участие NOD2-зависимых сигналов во врожденной защите от стафилококкового поражения кожи [19] и заживлении кожных ран [8].

Вышесказанное предопределило выбор иммуномодулятора Полимурамила как средства иммунотерапии хронической рецидивирующей пиодермии. Он представляет собой стандартизованную композицию трех природных мурамилпептидных фрагментов пептидогликана клеточной стенки грамотрицательных бактерий, которые являются агонистами NOD1 и NOD2 [9]. Показания к клиническому применению этого препарата включают различные формы пиодермии и вторичные иммунодефицитные состояния, проявляющиеся инфекционно-воспалительными хроническими и рецидивирующими процессами кожи.

Недавно завершено пострегистрационное исследование по оценке клинической и иммуномодулирующей активности Полимурамила у больных хронической рецидивирующей пиодермией. Предварительные данные этой работы опубликованы [4]. Вместе с тем целый ряд клинических и особенно иммунологических показателей остались за рамками указанной статьи.

Цель настоящей работы — представить окончательные, ранее не опубликованные данные исследования клинко-иммунологической эффективности Полимурамила у больных с хронической рецидивирующей пиодермией с акцентом на системные иммунологические показатели.

Материалы и методы

Исследование проведено как открытое двухцентровое рандомизированное испытание. У всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании.

Клиническими базами исследования являлись Многопрофильная профессорская клиника «СитиМед» центра ООО «Экология здоровья» (г. Челябинск) и ГБУЗ «Челябинский областной

клинический кожно-венерологический диспансер» (г. Челябинск).

Лабораторные исследования выполнены в клинко-диагностической лаборатории Многопрофильной профессорской клиники «Сити-Мед» центра ООО «Экология здоровья» (г. Челябинск) и центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Челябинск).

Полимурамил предоставлен для исследования ООО «Корус Фарм» в виде ампул по 0,5 мл, содержащих 200 мкг стандартизированной композиции трех мурамилпептидов, полученных из пептидогликана клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

В исследование включено 35 мужчин в возрасте 32 (27-40; 22-62) лет с обострением хронической рецидивирующей пиодермии (остеофолликулит, фолликулит, сикоз, фурункулез).

Критерии включения, невключения и исключения описаны ранее [4].

Распределение больных по группам проводилось случайным образом:

1) группа сравнения (17 человек), в которой пациенты получали стандартную терапию, включающую топические антибактериальные (фузидовая кислота в форме 2-процентного крема или мази наружно на область высыпаний 3-4 раза в сутки в течение 7-14 дней) и антисептические средства (фукорцин наружно на область высыпаний 3-4 раза в сутки в течение 7-14 дней), а при необходимости (при распространенном процессе и/или поражении лица) — системно действующие антибактериальные препараты (доксциклина моногидрат 100 мг перорально 2 раза в сутки в течение 10 дней);

2) основная группа (18 человек), в которой больные в дополнение к стандартной терапии, описанной выше, получали внутримышечно Полимурамил по 200 мг ежедневно в течение 5 суток (1-й — 5-й дни исследования).

За 1 день до начала лечения (0-й день) у всех включенных в исследование больных собирали полный медицинский анамнез; осуществляли физикальный осмотр с фотофиксацией и дерматоскопией, клинический анализ крови, посев из фурункула (при возможности взятия материала).

Каждый день с 0-го по 7-й день, затем на 14-е сутки, через 1 и 6 месяцев исследования оценивали клинические симптомы пиодермии, в том числе подсчитывали число пустул/фурункулов в стадии нагноения и инфильтрации.

Критерии общей оценки клинической эффективности

Клинические результаты проводимого лечения на 14-й день, через 1 и 6 месяцев исследова-

ния оценивали как «значительное улучшение», «улучшение», «без эффекта» в соответствии с критериями, детально описанными ранее [4]. Кратко, значительным улучшением считали индукцию и сохранение полной клинической ремиссии; улучшением — индукцию и сохранение частичной ремиссии; без эффекта — сохраняющиеся признаки воспалительного процесса и отсутствие ремиссии.

Методы иммунологических исследований

Образцы крови для изучения иммунологических показателей отбирали на 0-й и 14-й день, через 1 и 6 месяцев исследования.

Функциональную активность нейтрофилов периферической крови определяли по их способности поглощать частицы латекса с вычислением фагоцитарного индекса (доли активно фагоцитирующих нейтрофилов) и фагоцитарного числа (среднего числа поглощенных микросфер латекса одним фагоцитом) [1].

Способность нейтрофилов к кислородзависимому киллингу определяли в тестах по спонтанному и индуцированному восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ) [5].

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови определяли методом проточной цитофлуориметрии [6] с помощью цитометра FC 500 Cytomics и двух-четырёх-параметрических реагентов линии IQ Test производства компании Beckman Coulter.

Уровень иммуноглобулинов А, G и М определяли турбидиметрическим методом с использованием реагентов фирмы Human согласно инструкции производителя.

Условной нормой иммунологических показателей считали референсные значения, принятые в клинко-диагностической лаборатории Многопрофильной профессорской клиники «Сити-Мед» центра ООО «Экология здоровья» (г. Челябинск).

Статистическая обработка результатов

Полученные данные обработаны в программе Statistica 10 (StatSoft, США). Количественные характеристики представлены в тексте и таблицах в виде «Медиана (25-й — 75-й процентиля; минимум — максимум)». Значимость отличий количественных показателей независимых выборок определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни, зависимых выборок — критерия Вилкоксона. Значимость отличий независимых выборок по качественным признакам оценивали с помощью точного критерия Фишера, зависимых выборок — критерия Мак-Немара. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$. При $0,05 \leq p < 0,1$ констатировали статистическую тенденцию к различию выборок.

Результаты и обсуждение

Рандомизация привела к формированию вполне сопоставимых выборок больных. Так, не выявлено математически подтвержденных отличий между группой сравнения и основной группой по возрасту (соответственно, 31 (26-40; 24-54) и 32 (27-40; 22-62) года), анамнестическим данным, в том числе по частоте рецидивов пиодермии в течение предыдущего года, числу пустул/фурункулов до лечения (соответственно, 8 (3-12; 1-25) и 16,5 (3-20; 1-30)) и другим исходным клиническим и лабораторным параметрам [4].

Все включенные в исследование пациенты завершили его в соответствии с протоколом. Не зарегистрировано ни одного случая непереносимости Полимурамила и нежелательных явлений, связанных с проводимым лечением.

При добавлении Полимурамила к стандартному лечению обострения хронической пиодермии обнаружен явный тренд к увеличению доли больных со значительным улучшением или улучшением на 14-й день исследования. В основной группе суммарная доля больных с любым клиническим улучшением была на 24% выше, чем в группе сравнения. Полимурамил в пять раз снижал относительное число больных с отсутствием эффекта от проведенного комплексного лечения. Однако значимость вышеуказанных различий соответствовала лишь уровню статистической тенденции (рис. 1).

Указанные тренды сохранялись в течение всего периода наблюдения (через 1 и 6 месяцев ис-

следования). Так, через 1 месяц в основной группе доля больных со значительным улучшением более чем в два раза превышала таковую в группе сравнения, что математически было очень близко к уровню, когда можно констатировать статистическую тенденцию к отличию ($p = 0,102$). И через 1, и через 6 месяцев наблюдения доля больных с отсутствием эффекта от проведенного лечения снижалась под влиянием иммуномодулятора более чем в два с половиной раза; однако степень различий между группами не достигала порога математически подтвержденной значимости, что можно по крайней мере отчасти объяснить небольшим количеством пациентов в группах (рис. 1).

Данные о более стремительном и стойком снижении числа пустул/фурункулов у больных, получавших Полимурамил в дополнение к стандартному лечению, были уже опубликованы [4]. Однако ранее при оценке способности иммуномодулятора увеличивать долю пациентов, у которых отсутствуют элементы пиодермии через 6 месяцев от начала исследования, использован двухсторонний точный критерий Фишера, что позволило зафиксировать положительный эффект Полимурамила по указанному параметру лишь на уровне статистической тенденции. В результате критического пересмотра варианта математической обработки этого фрагмента исследования в настоящей работе применен более уместный односторонний точный критерий Фишера. В итоге выявлено статистически значимое межгрупповое различие по доле пациентов

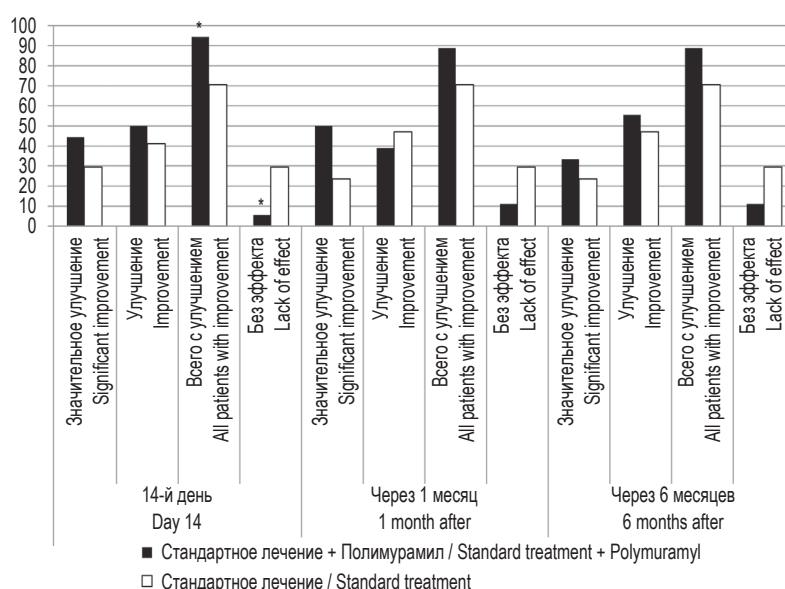


Рисунок 1. Доли больных с разным эффектом от проводимого лечения (%)

Примечание. Статистическая значимость отличий от показателей больных, получавших стандартное лечение (точный критерий Фишера): * – $p = 0,076$.

Figure 1. The proportion of patients with different effects of the treatment (%)

Note. Statistical significance of differences from indicators of patients receiving standard treatment (Fisher's exact test): *, $p = 0.076$.

без пустул/фурункулов через полгода: 9 из 18 и 3 из 17, соответственно, в основной группе и группе сравнения ($p = 0,047$).

Индукцию длительной ремиссии заболевания под влиянием короткого курса применения Полимурамила можно рассматривать как проявление NOD-опосредованного репрограммирования клеток врожденного иммунитета и формирования стойкого состояния повышенной сопротивляемости инфекциям, то есть феномена «тренированного иммунитета» [2].

Показатели спонтанной активности нейтрофилов по восстановлению НСТ исходно и в те-

чение всего исследования были в рамках референсных значений у подавляющего большинства включенных в исследование больных. До начала лечения и на 14-й день наблюдения медиана индекса спонтанного восстановления НСТ немного выходила за нижнюю границу условной нормы в обеих группах. Через полгода в группе сравнения этот индекс входил в диапазон референсных значений, тогда как у больных, получавших Полимурамил, даже несколько снижался. При этом не выявлено математически подтвержденных изменений внутри групп и различий между группа-

ТАБЛИЦА 1. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ПИОДЕРМИЕЙ НА ФОНЕ РАЗНЫХ ВАРИАНТОВ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 1. FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN PYODERMA PATIENTS RECEIVING DIFFERENT TREATMENT OPTIONS

Показатель Indicator	Референсные значения Reference values	Стандартное лечение Standard treatment			Стандартное лечение + Полимурамил Standard treatment + Polymuramyl		
		0-й день Day 0	14-й день Day 14	Через 6 месяцев After 6 months	0-й день Day 0	14-й день Day 14	Через 6 месяцев After 6 months
НСТ – спонтанная активность (%) NBT, spontaneous activity (%)	0-15	4,5 (3,5-7,5; 2-9)	6 (3-9; 2-38)	7,5 (3-14; 3-20)	7 (2-11; 1-16)	8 (3-9; 1-34)	2,5 (2-5; 1-31)
НСТ – спонтанный индекс (у. е.) NBT, spontaneous index (c. u.)	0,10-0,15	0,065 (0,040-0,095; 0,02-0,11)	0,07 (0,04-0,11; 0,02-0,51)	0,13 (0,03-0,22; 0,03-0,33)	0,095 (0,02-0,15; 0,02-0,19)	0,085 (0,03-0,12; 0,01-0,45)	0,025 (0,02-0,05; 0,01-0,34)
НСТ – индуцированная активность (%) NBT, induced activity (%)	28-60	43 (34-55; 27-58)	43 (31-49; 27-75)	47,5 (40-58; 40-61)	40 (39-45; 27-56)	40 (34-44; 27-52)	43 (35,0-48,5; 30-63)
НСТ – индуцированный индекс (у. е.) NBT, induced index (c. u.)	0,4-1,5	0,57 (0,485-0,735; 0,37-0,99)	0,69 (0,56-0,85; 0,37-1,28)	0,755 (0,61-0,86; 0,61-0,98)	0,59 (0,49-0,72; 0,36-0,93)	0,6 (0,56-0,64; 0,37-0,98)	0,68 (0,545-0,795; 0,45-1,12)
Фагоцитарный индекс (%) Phagocytic index (%)	30-80	58 (53,5-65,5; 47-79)	65 (57-70; 54-88)*	65 (64-73; 57-75)	60,5 (54-67; 48-82)	62 (56-67; 46-75)	56,5 (50,5-67,0; 48-77)
Фагоцитарное число (у. е.) Phagocytic number (c. u.)	2-9	7,0 (6,95-8,65; 5,0-9,9)	7,9 (6,9-10,2; 5,6-10,8)	8,6 (6,4-9,2; 5,2-9,2)	7,4 (6,1-8,0; 4,6-10,5)	7,9 (7,0-8,7; 4,9-9,6)	6,2 (5,2-8,0; 5,2-10,4)

Примечание. Статистическая значимость отличий от показателей в 0-й день исследования (критерий Вилкоксона): * – $p = 0,049$.

Note. Statistical significance of differences from the indicators on day 0 of the study (Wilcoxon test): * – $p = 0.049$.

ТАБЛИЦА 2. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПИОДЕРМИЕЙ НА ФОНЕ РАЗНЫХ ВАРИАНТОВ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 2. SUBPOPULATION COMPOSITION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PYODERMA PATIENTS RECEIVING DIFFERENT TREATMENT OPTIONS

Показатель Indicator	Референсные значения Reference values	Стандартное лечение Standard treatment			Стандартное лечение + Полимурамил Standard treatment + Polymuramyl		
		0-й день Day 0	14-й день Day 14	Через 6 месяцев After 6 months	0-й день Day 0	14-й день Day 14	Через 6 месяцев After 6 months
CD3⁺CD19⁺ клетки (%) CD3 ⁺ CD19 ⁺ cells (%)	61-85	67,4 (62,4-71,6; 59,9-74,5)	68,2 (63,5-72,6; 61,2-75,2)	66,9 (64,0-70,8; 57,2-77,0)	70,1 (65,5-71,0; 52,0-75,2)	70,0 (68,3-71,5; 39,2-78,7)	69,5 (67,2-75,3; 65,8-77,8)
CD3⁺CD19⁺ клетки (× 10⁶ клеток/л) CD3 ⁺ CD19 ⁺ cells (× 10 ⁶ cells/l)	946-2079	1400 (1283-1706; 1080-2461)	1399 (1221-1782; 1071-2052)	1310 (1117-1530; 1117-1993)	1296 (1080-1661; 651-2052)	1360 (1064-1670; 612-2581)	1537 (1300-1841; 948-2202)
CD3⁺CD4⁺ клетки (%) CD3 ⁺ CD4 ⁺ cells (%)	35-55	42,3 (32,3-45,8; 24,1-50,3)	39,4 (33,0-44,6; 23,0-49,8)	37,4 (32,3-49,0; 32,3-54,2)	40,1 (36,7-42,7; 33,5-48,7)	41,9 (39,2-44,5; 30,2-48,3)	42,7 (37,4-46,8; 31,7-54,9)
CD3⁺CD4⁺ клетки (× 10⁶ клеток/л) CD3 ⁺ CD4 ⁺ cells (× 10 ⁶ cells/l)	576-1336	836 (709-988; 645-1256)	750 (649-1098; 613-1370)	835 (539-999; 539-1338)	789 (560-913; 371-1316)	835 (645-1024; 371-1418)	917 (710-1165; 521-1554)
CD3⁺CD8⁺ клетки (%) CD3 ⁺ CD8 ⁺ cells (%)	19-35	25,6 (19,5-28,9; 13,2-35,8)	27,7 (21,1-31,7; 16,3-39,5)	23,7 (21,2-25,0; 16,1-29,5)	23,4 (19,0-30,1; 17,5-35,1)	25,8 (21,1-27,5; 16,6-37,5)	26,3 (19,9-29,8; 16,9-65,4)
CD3⁺CD8⁺ клетки (× 10⁶ клеток/л) CD3 ⁺ CD8 ⁺ cells (× 10 ⁶ cells/l)	372-974	507 (388-709; 279-1385)	582 (468-627; 397-1114)	418 (399-579; 349-705)	521 (335-641; 215-714)	473 (372-612; 215-804)	502 (460-593; 426-807)
CD4⁺/CD8⁺ (у. е.) CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (с. u.)	1,8-2,2	1,5 (1,10-2,15; 0,68-3,75)	1,38 (1,11-1,86; 0,59-2,93)	1,8 (1,30-2,42; 1,17-2,50)	1,66 (1,32-2,04; 0,96-2,57)	1,69 (1,42-1,92; 0,81-2,55)	1,58 (1,21-2,38; 1,09-3,25)
CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клетки (%) CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ cells (%)	1-6	2,1 (1,7-2,9; 1,6-6,0)	2,1 (1,6-3,6; 1,1-4,5)	2,4 (1,6-3,1; 1,4-4,4)	2,6 (2,2-4,1; 1,1-5,8)	2,4 (2,0-3,0; 1,5-4,5)	2,0 (1,7-2,7; 0,4-2,9)
CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клетки (× 10⁶ клеток/л) CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ cells (× 10 ⁶ cells/l)	7-165	47,5 (45,5-67,0; 31-115)	46 (38-65; 27-111)	48 (35-52; 26-105)	55,5 (31-70; 24-97)	43,5 (34-65; 28-100)	43,5 (29,0-58,5; 11-68)
CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клетки (%) CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ cells (%)	9-21	19,8 (17,5-23,9; 11,8-33,2)	18,7 (15,6-21,2; 10,0-24,9)	20,7 (18,1-22,6; 12,0-24,1)	20,7 (18,6-21,8; 11,8-38,1)	19,6 (17,1-22,1; 10,2-27,5)	18,1 (13,7-19,7; 12,3-21,0)
CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клетки (× 10⁶ клеток/л) CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ cells (× 10 ⁶ cells/l)	123-369	459 (329-638; 171-913)	345 (298-497; 171-601)	413 (377-494; 187-598)	386 (320-514; 171-778)	398 (295-479; 171-608)	374 (292-416; 270-486)
CD3⁺CD19⁺ клетки (%) CD3 ⁺ CD19 ⁺ cells (%)	7-17	9,9 (9,2-12,4; 5,1-13,4)	10,3 (9,0-13,6; 7,3-24,2)	9,7 (8,7-14,0; 8,7-18,6)	8,9 (7,4-10,3; 5,2-14,5)	9,7 (8,3-10,9; 4,4-13,2)	10,1 (8,5-11,6; 8,1-14,8)
CD3⁺CD19⁺ клетки (× 10⁶ клеток/л) CD3 ⁺ CD19 ⁺ cells (× 10 ⁶ cells/l)	111-376	209 (178-322; 109-386)	223 (176-361; 110-682)	207 (145-335; 145-461)	178 (119-206; 85-309)	177 (134-269; 61-380)	213 (165-262; 145-411)

ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПИОДЕРМИЕЙ НА ФОНЕ РАЗНЫХ ВАРИАНТОВ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 3. CONCENTRATION OF IMMUNOGLOBULINS IN THE SERUM OF PATIENTS WITH PYODERMA RECEIVING DIFFERENT TREATMENT OPTIONS

Показатель Indicator	Референсные значения Reference values	Стандартное лечение Standard treatment			Стандартное лечение + Полимурамил Standard treatment + Polymuramyl		
		0-й день Day 0	14-й день Day 14	Через 6 месяцев After 6 months	0-й день Day 0	14-й день Day 14	Через 6 месяцев After 6 months
IgA (r/n) g/l	0,7-4,0	2,43 (2,04-3,08; 1,56-3,4)	2,89 (1,76-3,11; 1,48-3,26)	1,67 (1,37-3,11; 1,48-3,26)	1,97 (1,60-2,67; 1,49-4,18)	1,99 (1,76-2,97; 1,51-4,20)	2,25 (1,82-2,93; 1,72-3,99)
IgG (r/n) g/l	7-16	11,4 (10,6-12,1; 9,0-13,6)	11,6 (10,1-12,8; 8,8-15,2)	10,5 (9,6-11,8; 9,6-12,0)	11,5 (10,7-12,8; 7,1-20,6)	11,3 (10,6-12,8; 9,1-15,4)	11,2 (10,5-13,0; 10,1-13,8)
IgM (r/n) g/l	0,4-2,3	1,3 (0,60-1,54; 0,46-1,76)	1,13 (0,70-1,66; 0,42-1,97)	0,98 (0,60-1,62; 0,47-1,97)	0,9 (0,69-1,11; 0,38-2,07)	0,99 (0,62-1,39; 0,45-2,94)	0,93 (0,75-1,06; 0,47-1,54)

ми по активности и индексу спонтанного восстановления НСТ нейтрофилами (табл. 1).

Не установлено значимых исходных сдвигов, существенной динамики и межгрупповых различий и при оценке индуцированного восстановления НСТ нейтрофилами (табл. 1).

Фагоцитарный индекс и фагоцитарное число нейтрофилов также были в пределах референсных значений и не отличались между группами (табл. 1).

То, что клиническая действенность Полимурамила не сопровождалась вполне ожидаемыми значительными изменениями функциональной активности циркулирующих нейтрофильных гранулоцитов, можно объяснить особенностями дизайна исследования: отбор образцов крови для повторных иммунологических тестов выполняли через 9 дней (14-й день исследования) и полгода после окончания курса внутримышечных инъекций Полимурамила, когда прямые и опосредованные иммунокорректирующие эффекты иммуномодулятора в отношении функции короткоживущей популяции циркулирующих нейтрофилов и их предшественников могли нивелироваться другими эндогенными и экзогенными факторами.

Тенденцию к падению активности и индекса спонтанного НСТ-теста в основной группе через полгода наблюдения можно связать с клинической ремиссией заболевания и снижением выраженности стимулов для нейтрофилов со стороны патогенных микробов.

Абсолютное и относительное число клеток разных субпопуляций циркулирующих лимфоцитов (табл. 2) и показатели гуморально-

го звена иммунитета (табл. 3) у подавляющего большинства больных обеих групп не выходили за рамки условной нормы в течение всего исследования. Исключение составляли только CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клетки, медиана абсолютного количества которых исходно несколько превышала верхнюю границу референсного диапазона и в дальнейшем колебалась около этого же уровня вне существенной зависимости от варианта проведенного лечения (табл. 2).

Не выявлено статистически значимых межгрупповых отличий субпопуляционного состава лимфоцитов и концентраций основных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови на фоне высокой индивидуальной вариативности этих показателей. Вместе с тем у больных основной группы, в отличие от таковых группы сравнения, через 6 месяцев исследования отмечали тренд к повышению абсолютного числа Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻ клеток) в крови за счет CD3⁺CD4⁺ субпопуляции (табл. 2), а также концентрации IgA в сыворотке крови (табл. 3).

Не вызывает сомнений актуальность дальнейшего поиска высокоинформативных иммунологических критериев диагностики, прогноза и оценки эффективности лечения хронической пиодермии. Вместе с тем результаты работы в целом говорят о клиническом приоритете при назначении и мониторинге действенности иммуностропных препаратов при заболеваниях, связанных с вторичной недостаточностью противoinфекционной защиты. Во-первых, сдвиги системных показателей клеточного и гуморального иммунитета, за редкими исключениями, не могут быть самостоятельными критериями

назначения иммунокорректирующих средств. Во-вторых, изменения (в том числе нормализация) иммунологических параметров в большинстве клинических ситуаций едва ли могут отражать эффективность лечения хронических рецидивирующих инфекций. Первому и второму препятствуют: 1) широкий диапазон условно нормальных значений, а также высокая индивидуальная вариативность иммунологических показателей; 2) недостаточная ясность того, какое (флогогенное или защитное?) значение имеют исходные и/или вызванные иммунокорректирующей терапией иммунологические сдвиги у пациентов; 3) сложный многогранный характер взаимодействий между меняющимися на фоне проводимого ле-

чения саногенетическими/патогенетическими процессами и биологическими эффектами самих иммуномодуляторов.

Таким образом, подтверждена клиническая эффективность Полимурамила в лечении обострений и индукции ремиссии хронической рецидивирующей пиодермии. При этом в рамках дизайна настоящего исследования и выбранных сроков взятия биологических образцов для лабораторных исследований иммуномодулятор существенно не изменял большинство изученных системных иммунологических показателей, за исключением ранее описанной модуляции уровня про- и противовоспалительных цитокинов [4].

Список литературы / References

1. Гончаров А.Г., Фрейншлин И.С., Смирнов В.С., Ботвиньева В.В., Щупленцева В.В., Ариненко Р.Ю. Основы клинической иммунологии и методологические подходы к оценке иммунного статуса: Практикум / Под общ. ред. М.Г. Романцева. Калининград: Калининградский университет, 1997. 73 с. [Goncharov A.G., Freindlin I.S., Smirnov V.S., Botvineva V.V., Shchuplentseva V.V., Arinenko R.Yu. Fundamentals of clinical immunology and methodological approaches to the assessment of the immune status: Practicum. Ed. by M.G. Romantsev]. Kaliningrad: Kaliningrad University, 1997. 73 p. (In Russ.)]
2. Калюжин О.В. Феномен тренированного иммунитета и механизмы действия неспецифических иммуномодуляторов // Российский аллергологический журнал, 2015. № 4. С. 45-51. [Kalyuzhin O.V. The trained immunity phenomenon and mechanisms of action of non-specific immunomodifiers. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergy Journal*, 2015, no. 4, pp. 45-51. (In Russ.)]
3. Караулов А.В., Калюжин О.В. Сфера применения мурамилпептидов в рамках основных подходов к иммунотерапии/иммунопрофилактике инфекционных болезней // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика, 2013. Т. 17, № 5. С. 3-15. [Karaulov A.V., Kalyuzhin O.V. Sphere of muramyl dipeptide application within the major approaches to immunotherapy/prophylaxis of infectious diseases. *Fiziologiya i patologiya immunoj sistemy. Immunofarmakogenomika = Physiology and Pathology of the Immune System. Immunopharmacogenomics*, 2013, Vol. 17, no. 5, pp. 3-15. (In Russ.)]
4. Летяева О.И., Зиганшин О.Р., Маркеева Д.А., Блохина Ю.В., Алексеева Н.Ю., Баранова Н.И., Калюжин О.В. Клиническая и цитокин-модулирующая эффективность композиции трех мурамилпептидов, содержащих остаток мезо-диаминопимелиновой кислоты, при хронической пиодермии // Русский медицинский журнал, 2018. № 8 (I). С. 9-13. [Letyaeva O.I., Ziganshin O.R., Markeeva D.A., Blokhina Yu.V., Alekseeva N.Yu., Baranova N.I., Kalyuzhin O.V. Clinical and cytokine-modulating efficacy of a composition of three muramylpeptides containing a meso-diaminopimelic acid residue in the chronic pyoderma. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2018, no. 8 (I), pp. 9-13. (In Russ.)]
5. Маянский А.Н. Лекции по иммунологии. Н. Новгород: Нижегородская государственная медицинская академия, 2003. 272 с. [Mayansky A.N. Lectures on immunology]. N. Novgorod: N. Novgorod State Medical Academy, 2003. 272 p.
6. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.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., Baidun L., Zurochka A., Totolyan A. Standardization technology "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytometer 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.
7. Bitschar K., Wolz C., Krismer B., Peschel A., Schitteck B. Keratinocytes as sensors and central players in the immune defense against *Staphylococcus aureus* in the skin. *J. Dermatol. Sci.*, 2017, Vol. 87, no. 3, pp. 215-220.
8. Campbell L., Williams H., Crompton R.A., Cruickshank S.M., Hardman M.J. Nod2 deficiency impairs inflammatory and epithelial aspects of the cutaneous wound-healing response. *J. Pathol.*, 2013, Vol. 229, pp. 121-131.
9. Dagil Y.A., Arbatsky N.P., Pashenkov M.V., Alkhazova B.I., Lvov V.L., Mazurov D.V. The Dual NOD1/NOD2 Agonism of Muropeptides Containing a Meso-Diaminopimelic Acid Residue. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 8, e0160784. doi:10.1371/journal.pone.0160784.
10. Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreux D., Caroff M., Cavaillon J.M., Philpott D.J., Adib-Conquy M. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.*, 2005, Vol. 35, no. 8, pp. 2459-2470.
11. Ekman A.K., Cardell L.O. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology*, 2010, Vol. 130, no. 1, pp. 55-63.
12. Harder J., Núñez G. Functional expression of the intracellular pattern recognition receptor NOD1 in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 2009, Vol. 129, no. 5, pp. 1299-1302.

13. Hertzen E., Johansson L., Wallin R., Schmidt H., Kroll M., Rehn A.P., Kotb M., Mörgelin M., Norrby-Teglund A. M1-protein dependent intracellular trafficking promotes persistence and replication of *Streptococcus pyogenes* in macrophages. *J. Innate Immun.*, 2010, Vol. 2, pp. 534-545.
14. Kobayashi M., Yoshiki R., Sakabe J., Kabashima K., Nakamura M., Tokura Y. Expression of toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.*, 2009, Vol. 160, no. 2, pp. 297-304.
15. Masumoto J., Yang K., Varambally S., Hasegawa M., Tomlins S.A., Qiu S., Fujimoto Y., Kawasaki A., Foster S.J., Horie Y., Mak T.W., Núñez G., Chinnaiyan A.M., Fukase K., Inohara N. Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, no. 1, pp. 203-213.
16. Mukherjee T., Hovingh E.S., Foerster E.G., Abdel-Nour M., Philpott D.J., Girardin S.E. NOD1 and NOD2 in inflammation, immunity and disease. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2019, Vol. 670, pp. 69-81.
17. Nizet V. Bacteria and phagocytes: mortal enemies. *J. Innate Immun.*, 2010, Vol. 2, no. 6, pp. 505-507.
18. Pashenkov M.V., Dagil Y.A., Pinegin B.V. NOD1 and NOD2: Molecular targets in prevention and treatment of infectious diseases. *Int. Immunopharmacol.*, 2018, Vol. 54, pp. 385-400.
19. Roth S.A., Simanski M., Rademacher F., Schröder L., Harder J. The pattern recognition receptor NOD2 mediates *Staphylococcus aureus*-induced IL-17C expression in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 2014, Vol. 134, no. 2, pp. 374-380.
20. Smagur J., Guzik K., Magiera L., Bzowska M., Gruca M., Thogersen I.B., Enghild J.J., Potempa J. A new pathway of staphylococcal pathogenesis: Apoptosis-like death induced by staphopain B in human neutrophils and monocytes. *J. Innate Immun.*, 2009, Vol. 1, pp. 98-108.
21. van Avondt K., van Sorge N.M., Meygaard L. Bacterial immune evasion through manipulation of host inhibitory immune signaling. *PLoS Pathog.*, 2015, Vol. 11, no. 3, e1004644. doi: 10.1371/journal.ppat.1004644.

Авторы:

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

Летяева О.И. — д.м.н., доцент, профессор кафедры дерматовенерологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»; врач-дерматовенеролог, Многопрофильная профессорская клиника «СитиМед» центра ООО «Экология здоровья», г. Челябинск, Россия

Зиганшин О.Р. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой дерматовенерологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

Маркеева Д.А. — врач-дерматовенеролог, Многопрофильная профессорская клиника «СитиМед» центра ООО «Экология здоровья», г. Челябинск, Россия

Блохина Ю.В. — врач-дерматовенеролог ГБУЗ «Челябинский областной клинический кожно-венерологический диспансер», г. Челябинск, Россия

Феденко Е.С. — д.м.н., профессор, заведующая отделением аллергологии и иммунопатологии кожи ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» ФМБА России, Москва, Россия

Попилук С.Ф. — директор по инновациям ООО «Корус-Фарма» — резидента кластера «Биомедицинские технологии» фонда «Сколково», Москва, Россия

Authors:

Kalyuzhnik O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology and Allergy, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Letyaeva O.I., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Dermatovenereology, South Ural State Medical University; Dermatovenereologist, Multi-profile Professorial Clinic CityMed, "Ecology of Health" Center, Chelyabinsk, Russian Federation

Ziganshin O.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Dermatovenereology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Markeeva D.A., Dermatovenereologist, Multi-profile Professorial Clinic CityMed, "Ecology of Health" Center, Chelyabinsk, Russian Federation

Blokhina Yu.V., Dermatovenereologist, Chelyabinsk Regional Clinical Dermato-venereal Dispensary, Chelyabinsk, Russian Federation

Fedenko E.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Skin Allergy and Immunopathology, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Popilyuk S.F., Director for Innovation, Corus-Pharma Ltd — Resident of Skolkovo Foundation, Moscow, Russian Federation

Поступила 01.04.2019

Отправлена на доработку 05.04.2019

Принята к печати 16.04.2019

Received 01.04.2019

Revision received 05.04.2019

Accepted 16.04.2019

ОЦЕНКА ВЗАИМООТНОШЕНИЙ МЕЖДУ НЕЙРОТРОПНЫМИ АНТИТЕЛАМИ И ОТДЕЛЬНЫМИ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У ПАЦИЕНТОВ С ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ РТУТНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ В ПОСТКОНТАКТНОМ ПЕРИОДЕ

Боклаженко Е.В., Бодиенкова Г.М., Русанова Д.В.

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Россия

Резюме. Нарушения в нервной системе при хронической ртутной интоксикации (ХРИ) сопровождаются закономерными изменениями в иммунной системе. Одним из перспективных направлений современной нейроиммунологии является использование нейроспецифических белков в качестве маркеров различных патологических изменений, происходящих в ЦНС. Ртуть при длительном контакте с ее парами способна вызывать нарушения со стороны нервных клеток как ЦНС, так и периферических нервов. Вместе с тем недостаточно изучены особенности нейроиммунных взаимоотношений, лежащих в основе формирования патологии, особенно в отдаленном постконтактном периоде нейроинтоксикации ртутью. Цель работы заключалась в выявлении взаимосвязи между содержанием АТ к нейротропным белкам нервной ткани и изменениями нейрофизиологических показателей, характеризующих состояние проводящих путей центральной и периферической нервной системы у пациентов в постконтактном периоде ХРИ. В иммунологическое исследование включено 30 мужчин в постконтактном периоде ХРИ, ранее работавших в контакте с парами металлической ртути. В клинической картине пациентов доминирует энцефалопатия, основным проявлением которой являются психические расстройства (чаще в виде органического астенического расстройства или органического расстройства личности с когнитивными и эмоционально-волевыми нарушениями различной степени выраженности). Критериями включения в исследование являлись: верифицированный диагноз у всех обследованных, письменное информированное согласие на участие в исследовании, в анамнезе вредное воздействие паров металлической ртути в условиях производства. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica for Windows 6.0. Проведено исследование уровней нейротропных антител (АТ), соматосенсорных вызванных потенциалов (ССВП), элекронейромиография (ЭНМГ) в плане изучения взаимоотношений между изменениями в специализированных структурах нервной ткани и состоянием проводящих путей центральной и периферической нервной системы у пациентов в постконтактном периоде ХРИ. Обнаружены корреляции: между концентрациями АТ к β -эндорфину (β -END) и изменениями в центральных проводящих структурах, а также между АТ к белкам S-100, ОБМ, GFAP, NF-200, В-зав. Са-каналу, MAG, β -END, АХ-Р, Сер-Р, М-ОР и скоростью проведения импульсов по аксонам различных структур периферической нервной системы. Выявленные в настоящем исследовании взаимосвязи указывают на патологию

Адрес для переписки:

Боклаженко Елена Валерьевна
ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-
экологических исследований»
665827, Россия, Иркутская обл., г. Ангарск,
12а микрорайон, 3.
Тел.: 8 (3955) 55-75-66.
E-mail: immun11@yandex.ru

Address for correspondence:

Boklazhenko Elena V.
East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research
665827, Russian Federation, Irkutsk Region, Angarsk,
12a microdistrict, 3.
Phone: 7 (3955) 55-75-66.
E-mail: immun11@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.В. Боклаженко, Г.М. Бодиенкова, Д.В. Русанова
«Оценка взаимоотношений между нейротропными
антителами и отдельными нейрофизиологическими
показателями у пациентов с профессиональной
хронической ртутной интоксикацией
в постконтактном периоде» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1197-1202.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1197-1202

© Боклаженко Е.В. и соавт., 2019

For citation:

E.V. Boklazhenko, G.M. Bodienkova, D.V. Rusanova
“Studies of interrelations between neurotrophic antibodies
and individual neurophysiological indices in patients with
professional chronic mercury intoxication at the post-exposure
period”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1197-1202.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1197-1202

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1197-1202

ческие изменения в специализированных структурах нервной ткани, которые можно использовать в качестве диагностических показателей течения ХРИ в постконтактном периоде.

Ключевые слова: иммунная система, нейротропные антитела, центральные и периферические проводящие пути нервной системы, электронейромиографическое исследование, хроническая ртутная интоксикация

STUDIES OF INTERRELATIONS BETWEEN NEUROTROPHIC ANTIBODIES AND INDIVIDUAL NEUROPHYSIOLOGICAL INDICES IN PATIENTS WITH PROFESSIONAL CHRONIC MERCURY INTOXICATION AT THE POST-EXPOSURE PERIOD

Boklazhenko E.V., Bodienkova G.M., Rusanova D.V.

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Russian Federation

Abstract. Disturbances in the nervous system during chronic mercury intoxication (CMI) are accompanied by regular changes in the immune system. Diagnostic use of neurospecific protein markers of various pathological changes in the central nervous system is one of the promising areas of modern neuroimmunology. Prolonged exposure to the mercury vapors may cause disturbances of both CNS neurons and peripheral nerves. At the same time, the neuroimmune relationships underlying the evolving disease are not studied to sufficient grade, especially in the later post-contact period of chronic mercury intoxication. The aim of this work was to identify the relationship between the contents of antibodies to neurotrophic proteins of the nervous tissue, and changes of the neurophysiological indices characterizing the state of central and peripheral pathways in the nervous systems of the patients after chronic mercury intoxication (CMI). Our study immunological study included 30 males in the post-contact period of the CMI, who previously worked in contact with metallic mercury vapors. The clinical patterns of patients were dominated by encephalopathy, the main manifestation of which are mental disorders (more often in the form of organic asthenic disorder, or organic personality disorder with cognitive and emotional-volitional disorders of varying severity). The criteria for inclusion in the study were: verified diagnosis in all patients, written informed consent to participate in the study, a history of the harmful effects of metallic mercury vapor under production conditions. Statistical evaluation was carried out using Statistica for Windows 6.0 software. The levels of neurotrophic antibodies (AT), somatosensory evoked potentials (SSEP), electroneuromyography (ENMG) data were studied in terms of assessing the relationship between changes in specialized structures of the nervous tissue, and the state of the central and peripheral neural pathways in the patients after chronic mercury exposure. The following correlations were found: those between the concentrations of antibodies to endorphin β (β -END) and changes in central conducting structures, as well as between antibodies to proteins S-100, MBP, GFAP, NF-200, VG calcium channel, MAG, β -END, AH-R, Ser-R, M-OR and the speed of axonal impulse conduction within various peripheral neural structures. The interrelations revealed in this study indicate to pathological changes in specialized structures of the nervous tissue, which may be used as diagnostic indicators for clinical course of CMI in the post-contact period.

Keywords: immune system, neurotropic antibodies, central and peripheral pathways of the nervous system, electroneuromyographic study, chronic mercury intoxication

Введение

Проблема токсических поражений нервной системы на сегодняшний день актуальна для медицины и экологии человека в целом, а неврологические нарушения при ХРИ являются не только наиболее частыми осложнениями, но и ведущей причиной инвалидности, приводящей к сокращению продолжительности жизни. Нарушения в нервной системе при ХРИ сопровождаются закономерными изменениями иммунологического надзора, которые могут играть роль свидетеля патологического процесса.

Интерес исследователей к отдаленному (постконтактному) периоду нейроинтоксикаций вы-

зван противоречивостью сведений о регрессе психоэмоциональных и вегетативных нарушений на фоне глубоких морфологических изменений, завершающихся дегенеративными явлениями в обменных процессах, нервной и сердечно-сосудистой системах [7, 8]. Многолетние исследования сотрудников института согласуются с данными ряда авторов [2, 3, 4] о прогрессировании в постконтактном периоде ХРИ психопатологических проявлений, доминирующих над неврологической симптоматикой, с формированием энцефалопатий и развитием выраженных форм психоорганического синдрома [6, 7]. У пациентов с токсической энцефалопатией выявляются значительные личностные нарушения, которые

свидетельствуют о социально-психической дезадаптации [1, 6], что обуславливает сложность реабилитации таких больных.

Одним из перспективных направлений современной нейроиммунологии является использование нейроспецифических АТ в качестве маркеров различных патологических изменений, происходящих в нервной системе [5, 9, 10, 14]. В связи с этим большое внимание в последние годы уделяется изучению механизмов формирования поражений ЦНС от воздействия химических веществ, обладающих нейротропным действием. У пациентов с разными формами заболеваний ЦНС в крови кумулируются аутоантитела к нейрональным и глиальным элементам, мозгоспецифическим белкам, нейротрансмиттерам и их рецепторам, которые могут являться предикторами функциональных нарушений или свидетелями патологического процесса в ЦНС. Аутоиммунные реакции являются важным патогенетическим звеном энцефалопатии любой природы, при этом аутоантитела к нейроспецифическим белкам (как и сами нейроспецифические антигены) могут служить уникальными маркерами патологического состояния ткани головного мозга [10, 15].

При отравлениях химическими веществами, в частности ртутью, выявляется дегенерация нервных клеток как ЦНС, особенно коры мозга и ретикулярной формации мозгового ствола, так и периферических нервов [12, 13]. Вместе с тем недостаточно изучены особенности нейроиммунных взаимоотношений, лежащих в основе формирования патологии, особенно в отдаленном постконтактном периоде нейроинтоксикации ртутью.

В связи с вышесказанным **целью работы** заключалась в выявлении взаимосвязи между содержанием АТ к нейротропным белкам нервной ткани и изменениями нейрофизиологических показателей, характеризующих состояние проводящих путей центральной и периферической нервной системы у пациентов в постконтактном периоде ХРИ.

Материалы и методы

Проведено обследование 30 мужчин в постконтактном периоде ХРИ, ранее работавших в контакте с парами металлической ртути. В клинической картине пациентов доминирует энцефалопатия, основным проявлением которой являются психические расстройства (чаще в виде органического астенического расстройства или органического расстройства личности с когнитивными и эмоционально-волевыми нарушениями различной степени выраженности). Постановка диагноза осуществлялась врачами-профпатологами в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра

(МКБ-10). Критериями включения в исследование являлись: верифицированный диагноз у всех обследованных, письменное информированное согласие на участие в исследовании, вредное воздействие паров металлической ртути в условиях производства. Средний возраст обследованных составил $53,3 \pm 0,82$ года, стаж работы в условиях воздействия паров металлической ртути — $15,6 \pm 0,8$ лет.

Забор крови у пациентов проводили в утренние часы натощак, используя пробирки Vacutainer. Пробирки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 минут для получения сыворотки. Сывороточные концентрации АТ к белкам: β -эндорфину (β -END), нейрофиламентному протеину-200 (NF-200), глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP), белку S-100, основному белку миелина (ОБМ), кальциевым каналам клеток (В-зав. Са-каналу), а также к ГАМК, дофаминовым, серотониновым, глутаматным, М-опиатным и Н-холино-рецепторам (ДА-Р, Сер-Р, Глу-Р, М-ОР и АХ-Р) определяли с помощью иммуноферментного метода стандартными тест-системами «ЭЛИ-Нейро-Тест» Московского научно-производственного объединения «Иммункукус» (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/04554 от 23.03.2009 г.). Соматосенсорные вызванные потенциалы (ССВП), регистрируемые на срединном нерве в области запястья, и электронейромиография (ЭНМГ) смешанных нервов верхних и нижних конечностей при стандартном наложении поверхностных электродов проводились на миографе «Нейро-ЭМГ-Микро» («Нейрософт», г. Иваново).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли на персональном компьютере с использованием пакета программ Statistica 6.0. Проверку гипотезы о виде распределений проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для определения взаимного влияния показателей использовали корреляционный анализ Спирмена r . Рассчитывали показатель достоверности (p), который определяли как статистически значимый при значениях $p < 0,05$. Работа не ущемляет права и не подвергает опасности благополучие обследованных пациентов в соответствии с требованиями биомедицинской этики, утвержденными Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Протокол исследований согласован с этическим комитетом (протокол № 6 от 15.11.2012 г.).

Результаты и обсуждение

Результаты ранее выполненных исследований позволили установить, что течение ртутной интоксикации у пациентов с нарушением периферического кровотока в постконтактном периоде сопровождалось повышением антител к мозго-

ТАБЛИЦА 1. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ (КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМЕНА r) МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИМИ СОСТОЯНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ, И УРОВНЕМ АТ К НЕЙРОТРОПНЫМ БЕЛКАМ У ПАЦИЕНТОВ С ХРИ

TABLE 1. CORRELATION (SPEARMAN r CORRELATION COEFFICIENTS) BETWEEN THE INDICATORS CHARACTERIZING THE STATE OF THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM AND THE LEVEL OF ANTIBODIES TO NEUROTROPIC PROTEINS IN PATIENTS WITH CMI

Показатели Indicators		Антитела к: Antibodies to:									
		S-100	ОБМ MBP	GFAP	NF-200	В-зав. кальц. канал VG calcium channel	АХ-Р ACh-R	Сер-Р Ser-R	MAG	β -END	M-OP
Локтевой нерв Ulnar nerve	Амплитуда М-ответа Amplitude of M response	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	СПИпр. IVpr.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	СПИл. IVI.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	СПИд. IVd	0,416	-	-	-	0,487	0,410	-	0,465	-	-
	п/д коэф. p/d coef.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Рез. лат. Res. lat.	-	-	-	-	-	-	-	0,399	-	-
Большеберцовый нерв Tibial nerve	Амплитуда М-ответа Amplitude of M response	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	СПИпр. IVpr.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	СПИл. IVI.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	СПИд. IVd	-	-0,433	-0,641	-0,467	-	-	-0,452	-	-0,579	-0,424
	п/д коэф. p/d coef.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Рез. лат. Res. lat.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Представленные значения r соответствуют $p < 0,05$; прочерки означают значения r , соответствующие $p > 0,05$.

Note. Presented values of r correspond to $p < 0.05$; dashes indicate r values corresponding to $p > 0.05$

специфическим белкам S-100, ОБМ и MAG [11]. В этой связи на следующем этапе нашей работы представляло определенный интерес у пациентов с ХРИ в постконтактном периоде выявить взаимосвязь между расширенным спектром нейротропных АТ и изменением нейрофизиологических показателей (ССВП и ЭНМГ), отражающих состояние центральных афферентных проводящих структур и периферических нервов. Соматосенсорные потенциалы представляют собой афферентные ответы с различных структур сенсорной системы в ответ на электростимуляцию периферических нервов. При регистрации ССВП можно получить четкие ответы со всех

уровней соматосенсорного пути и коры, что является вполне адекватной информацией о поражении как проводящих путей головного и спинного мозга, так и сенсомоторной коры.

В результате исследования у пациентов с профессиональной ХРИ в постконтактном периоде установлены прямые корреляционные зависимости между потенциалами, регистрируемыми в области плечевого сплетения (компонентами N9, N10) и уровнем АТ к β -END ($r = 0,567$, $p = 0,01$; $r = 0,426$, $p = 0,04$). Следует отметить, что изменение антителогенеза к β -END является индикатором поражения ЦНС, возможным признаком нарушений эмоционально-мотиваци-

онной сферы [10, 16]. При этом установленные зависимости позволяют предположить, что у пациентов в постконтактном периоде ХРИ происходят патологические изменения в структурах соматосенсорных проводящих путей, проходящих через плечевое сплетение, центральные отростки задних корешков и спинной мозг (на уровне N9, N10).

Результаты корреляционного анализа между показателями, характеризующими периферическую нервную систему (ЭНМГ), и содержанием нейротропных АТ также позволили выявить определенные взаимосвязи (табл. 1). Так, изменения содержания АТ к белкам β -END, ОБМ, GFAP, NF-200, рецепторам нейромедиаторов Сер, М-ОР сопряжены с нарушениями скорости проведения импульсов в дистальном отделе большеберцового нерва ($r = -0,579$, $p = 0,002$; $r = -0,433$, $p = 0,03$; $r = -0,641$, $p = 0,0005$; $r = -0,467$, $p = 0,02$; $r = -0,452$, $p = 0,02$; $r = -0,424$, $p = 0,03$ соответственно). Возрастание концентраций АТ к белкам S-100, В-зав. Са-каналу, АХ-Р, MAG сопровождалось изменением скорости проведения импульса по локтевому нерву ($r = 0,416$, $p = 0,039$; $r = 0,487$, $p = 0,01$; $r = 0,410$, $p = 0,04$; $r = 0,465$, $p = 0,01$ соответственно), а повышение концентрации АТ к MAG — еще и изменением резидуальной латентности локтевого нерва ($r = 0,399$, $p = 0,04$). Выявленные изменения подтверждают важную роль аутоиммунных реакций в патогенезе ХРИ, а взаимосвязь с показателями ЭНМГ больных с ХРИ свидетельствует о наличии патологических нарушений в функционировании периферических нервов на верхних и нижних конечностях.

Таким образом, в результате выполненных исследований установлены особенности взаимоотношений между сывороточными концентрациями нейротропных АТ к специализированным структурам нервной ткани и показателями, ха-

рактеризующими состояние проводящих структур центральной и периферической нервной системы у пациентов в постконтактном периоде ХРИ. А именно: повышение уровней АТ к белку β -END сопровождалось нарушением состояния центральных соматосенсорных проводящих путей, проходящих через плечевое сплетение, центральные отростки задних корешков и спинной мозг. Возрастание содержания АТ к белкам β -END, ОБМ, GFAP, NF-200, рецепторам Сер, М-ОР сопряжено со снижением скорости проведения импульсов в дистальном отделе большеберцового нерва. Повышение концентраций АТ к белку S-100, В-зав. Са-каналу, АХ-Р, MAG сопровождалось усилением скорости проведения импульса по локтевому нерву, а увеличение концентрации АТ к MAG — еще и повышением резидуальной латентности локтевого нерва. Снижение скорости проведения импульса по дистальному участку обследованных нервов отражает наличие процесса демиелинизации, а увеличение резидуальной латентности указывает на изменение состояния концевых немиелинизированных волокон. Установленные зависимости между содержанием нейротропных АТ и нейрофизиологическими показателями являются прямым подтверждением патогенетической роли аутоиммунных реакций в формировании демиелинизирующих изменений периферических нервов при воздействии паров металлической ртути. Учитывая представление об энцефалопатии как о хроническом, прогрессирующе текущем заболевании ЦНС, проходящем через ряд клинических стадий, установленные в настоящем исследовании взаимосвязи, указывающие на патологические изменения в специализированных структурах нервной ткани, можно использовать в качестве диагностических критериев течения ХРИ в постконтактном периоде.

Список литературы / References

1. Абдурасулова И.Н., Клименко В.М. Гетерогенность механизмов повреждения нервных клеток при демиелинизирующих аутоиммунных заболеваниях ЦНС // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2010. Т. 96, № 1. С. 50-68. [Abdurasulova I.N., Klimenko V.M. Heterogeneity of the mechanisms of damaging nervous cells in demyelinating autoimmune diseases of the CNS. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*, 2010, Vol. 96, no. 1, pp. 50-68. (In Russ.)]
2. Антонюженко В.А. Профессиональная вегетосенсорная полиневропатия химической этиологии (особенности формирования, клиника, диагностика) // Гигиена труда, 1991. № 2. С. 17-19. [Antonyuzhenko V.A. Professional vegetosensory polyneuropathy of chemical etiology (formation features, clinic, diagnostics). *Gigiena truda = Labor Hygiene*, 1991, no. 2, pp. 17-19. (In Russ.)]
3. Березин В.А. Аутоиммунные реакции при церебральной ишемии // Нейрохимия, 1990. № 1. С. 114-123. [Berezin V.A. Autoimmune reactions in cerebral ischemia. *Neyrokhiimiya = Neurochemistry*, 1990, no. 1, pp. 114-123. (In Russ.)]
4. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия. Л.: Медицина, 1986. 280 с. [Golikov S.N., Sanotsky I.V., Tiunov L.A. General mechanisms of toxic action]. Leningrad: Medicine, 1986. 280 p.
5. Евсеев В.А. Антитела к нейромедиаторам в механизмах нейроиммунопатологии. М.: Издательство РАМН, 2007. 148 с. [Evseev V.A. Antibodies to neurotransmitters in the mechanisms of neuroimmunopathology]. Moscow: RAMS Publishing House, 2007. 148 p.

6. Катаманова Е.В., Шевченко О.И., Лахман О.Л. Некоторые итоги изучения нейropsychологических особенностей лиц, подвергавшихся хроническому воздействию ртути в условиях химического производства // Медицина труда и промышленная экология, 2010. № 1. С. 19-23. [Katamanova E.V., Shevchenko O.I., Lakhman O.L. Neuropsychologic traits in individuals with chronic exposure to mercury at work. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya = Occupational Medicine and Industrial Ecology*, 2010, no. 1, pp. 19-23. (In Russ.)]
7. Колесов В.Г., Андреева О.К., Лахман О.Л., Казакова П.В., Мещерягин В.А. Психоэмоциональные расстройства в отдаленном периоде хронической ртутной интоксикации // Бюллетень ВСИЦ СО РАМН, 2003. № 2. С. 93-95. [Kolesov V.G., Andreeva O.K., Lakhman O.L., Kazakova P.V., Mescheryagin V.A. Psycho-emotional disorders in the long-term period of chronic mercury intoxication. *Byulleten VSNTS SO RAMN = Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2003, no. 2, pp. 93-95. (In Russ.)]
8. Крыжановский Г.Н. Общая теория патофизиологических механизмов неврологических и психопатологических синдромов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2002. № 11. С. 4-13. [Kryzhanovsky G.N. General theory of pathophysiological mechanisms of neurological and psychopathological syndromes. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2002, no. 11, pp. 4-13. (In Russ.)]
9. Кузнецова Л.В., Ветрилэ Л.А., Карпова М.Н. Некоторые нейроиммунные механизмы в патогенезе эпилепсии // Патогенез, 2014. Т. 12, № 2. С. 11-21. [Kuznetsova L.V., Vetrile L.A., Karpova M.N. Some neuroimmune mechanisms in pathogenesis of epilepsy. *Patogenez = Pathogenesis*, 2014, Vol. 12, no. 2, pp. 11-21. (In Russ.)]
10. Полетаев А.Б. Молекулярная диспансеризация (новые подходы к раннему проявлению патологических изменений в организме человека): введение в теорию и методические рекомендации для врачей. М.: МИЦ «Иммункулус», 2014. 80 с. [Poletaev A.B. Molecular clinical examination (new approaches to the early manifestation of pathological changes in the human body): Introduction to theory and Methodical recommendations for doctors]. Moscow: Medical Research Center Immunculus, 2014. 80 p.
11. Русанова Д.В., Лахман О.Л., Бодиенкова Г.М., Купцова Н.Г. Механизмы формирования изменений состояния центральных проводящих структур нервной системы при воздействии металлической ртути // Медицина труда и промышленная экология, 2017. № 1. С. 42-46. [Rusanova D.V., Lakhman O.L., Bodienkova G.M., Kuptsova N.G. Mechanisms underlying changes in state of central nervous system pathways under exposure to metallic mercury. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya = Occupational Medicine and Industrial Ecology*, 2017, no. 1, pp. 42-46. (In Russ.)]
12. Тарасова Л.А., Думкин В.Н. Профессиональные заболевания с преимущественным поражением нервной системы. В кн.: Профессиональные заболевания. Под ред. Н.Ф. Измерова. М.: Медицина, 1996. Т. 1. С. 136-200. [Tarasova L.A., Dumkin V.N. Occupational diseases with a primary lesion of the nervous system. In the book: *Occupational diseases*. Ed. N.F. Izmerov]. Moscow: Medicine, 1996, Vol. 1, pp. 136-200.
13. Трошин В.Д., Густов А.В., Смирнов А.А. Сосудистые заболевания нервной системы: руководство. Рекомендовано УМО. Н. Новгород: Изд-во НГМА, 2006. 538 с. [Troshin V.D., Gustov A.V., Smirnov A.A. Vascular diseases of the nervous system: a manual. Recommended by ULV]. N. Novgorod: Publishing house of Nizhny Novgorod State Medical Academy, 2006. 538 p.
14. DeMarshall C., Sarkar A., Nagele E.P., Goldwaser E., Godsey G., Acharya N.K., Nagele R.G. Utility of autoantibodies as biomarkers for diagnosis and staging of neurodegenerative diseases. *Int. Rev. Neurobiol.*, 2015, Vol. 122, pp. 1-51.
15. Gabis L., Shklar B., Geva D. Immediate influence of transcranial electrostimulation on pain and beta-endorphin blood levels: an active placebocontrolled study. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, 2003, Vol. 82, no. 2, pp. 81-85.

Авторы:

Боклаженко Е.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Россия

Бодиенкова Г.М. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Россия

Русанова Д.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории профессиональной и экологически обусловленной патологии ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Россия

Authors:

Boklazhenko E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Immunobiochemical and Molecular Genetic Studies in Hygiene, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Russian Federation

Bodienkova G.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunobiochemical and Molecular Genetic Studies in Hygiene, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Russian Federation

Rusanova D.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Professional and Environmental Diseases, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Russian Federation

Поступила 08.04.2019
Принята к печати 29.04.2019

Received 08.04.2019
Accepted 29.04.2019

К 90-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ЕЛЕНА АНДРЕЕВНА КОРНЕВОЙ



В декабре 2019 года исполняется 90 лет Елене Андреевне Корневой, выдающемуся ученому с мировым именем, основателю новой научной дисциплины — иммунофизиологии, много лет возглавлявшему отдел общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», академику РАН, доктору медицинских наук, профессору.

Вся творческая деятельность Е.А. Корневой, начиная с 1953 года, связана с Институтом экспериментальной медицины РАМН. Еще в 60-х годах Е.А. Корнева начала свои исследования в области физиологии иммунной системы. Ею был впервые поставлен и исследован вопрос о значении определенных структур мозга в регуляции функций иммунной системы. Полученные Е.А. Корневой данные были признаны открытием Госкомитетом по делам открытий и изобретений. Совокупность полученных результатов, а также предложенная Еленой Андреевной концепция организации многоуровневой системы нейрогуморальной регуляции иммунологических процессов в целостном организме явились основой для создания нового перспективного научного направления — иммунофизиологии (нейроиммунотропности, психонейроиммунологии), признанным лидером которого стала Е.А. Корнева.

С именем Е.А. Корневой во многом связано и превращение этого научного направления в новую, интенсивно развивающуюся научную дисциплину. Ее монография «Нейрогуморальное обеспечение иммунного гомеостаза» (1978), обобщающая результаты проведенных исследований, в 1985 году была переведена в США.

С выходом в США книги «Основатели психонейроиммунологии» (1986) Е.А. Корнева была официально признана одним из основоположников этой научной дисциплины.

В 1986 году Е.А. Корнева была избрана членом корреспондентом, а в 1997 году — действительным членом Российской академии медицинских наук.

Е.А. Корнева — один из крупнейших организаторов науки в нашей стране. С 1989 года на протяжении многих лет она являлась председателем комиссии «Иммунофизиология» при научном совете РАМН по экспериментальной и прикладной физиологии.

В 2004 году за выдающиеся заслуги в области исследования взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем организма, работу по организации и популяризации науки Е.А. Корнева награждена золотой медалью Президиума Всероссийского научного общества иммунологов.

Получив широкое международное признание как один из пионеров исследований в области физиологии иммунной системы, являясь одним из основателей Международного научного общества по нейроиммунотропности, Е.А. Корнева неоднократно избиралась вице-президентом этого

общества и являлась членом совета его директоров. В 1993-1996 годах — член президиума Международного общества психонейроиммунологии и почетный директор Фонда по психонейроиммунологии (США). В течение многих лет Е.А. Корнева была членом редколлегии международного журнала «Brain, Behavior and Immunity». С 1990 года — член редакционной коллегии Международного журнала «Нейроиммуномодуляция». Она состоит в числе членов редакционной коллегии журнала «Медицинская иммунология». На протяжении 20 лет Елена Андреевна являлась бессменным председателем правления Санкт-Петербургского отделения Всероссийского научного общества иммунологов. Е.А. Корнева активно занимается педагогической деятельностью. Впервые в стране в 1987 году она начала читать курс лекций по нейроиммуномодуляции в Санкт-Петербургском государственном университете. Под ее редакцией в 1993 году вышло первое в мире руководство «Иммунофизиология».

Созданная Е.А. Корневой отечественная научная школа иммунофизиологов признана как в нашей стране, так и за рубежом. Ее многочисленные ученики в настоящее время являются сотрудниками и руководителями крупных отечественных и зарубежных научных центров.

Современное развитие линии научных исследований Е.А. Корневой характеризуется все более углубленным изучением клеточно-молекулярных механизмов регуляции, нарушений и коррекции защитных функций организма уже на рецепторно-сигнальном и генетическом уровне реализации нейроиммунных взаимодействий.

Е.А. Корнева — автор более 470 научных работ, включая 6 монографий. Е.А. Корнева является профессионалом высшей квалификации, вызывающим глубокое уважение научной общественности и служащим примером для подражания подрастающей научной молодежи.

Редакционная коллегия журнала «Медицинская иммунология» желает Елене Андреевне Корневой еще много лет здоровья и продолжения плодотворной и яркой научной деятельности.

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

Абакумова Т.В.	1127	Воробейчиков Е.В.	1155	Конусова В.Г.	1155	Серебрякова М.К.	1081
Абрамова З.И.	1063	Генинг С.О.	1127	Кудрявцев И.В.	1081	Сесь Т.П.	1081
Аветисян А.О.	1099	Генинг Т.П.	1127	Лазарева Н.М.	1081	Сидоров С.В.	1115
Агарков Н.М.	1163	Давлетова К.И.	1115	Летяева О.И.	1187	Сизякина Л.П.	1073
Акберова Н.И.	1063	Давыдова Е.В.	1043	Логаткина А.В.	1169	Симбирцев А.С.	1155
Алексеева Л.А.	1033	Давыдова Н.И.	1099	Маркеева Д.А.	1187	Смольников И.В.	1179
Альтман Д.Ш.	1043	Долгова Д.Р.	1127	Михайлова Е.С.	1115	Тарлюн А.А.	1055
Андрианова И.А.	1063	Дурыманов А.Г.	1147	Монахова Н.Е.	1033	Татаркова Е.А.	1179
Антонеева И.И.	1127	Евтюгина Н.Г.	1063	Муженя Д.В.	1179	Терехов И.В.	1169
Аутеншлюс А.И.	1115	Епанчинцева А.В.	1147	Мягкова М.А.	1139	Торжкова П.Ю.	1147
Бажанов А.А.	1081	Еремеев В.В.	1015	Невзорова Т.А.	1063	Тотоян Арег А.	1081
Баранова О.П.	1081	Железникова Г.Ф.	1033	Никифоров В.С.	1169	Тугуз А.Р.	1179
Безрукова Е.В.	1155	Жирков А.А.	1033	Песков А.Б.	1127	Туранская А.И.	1023
Бессонова Т.В.	1033	Жирнов В.А.	1147	Петроченко С.Н.	1139	Феденко Е.С.	1187
Биктагирова Э.М.	1063	Жураковский И.П.	1115	Плехова Н.Г.	1023	Харитонов М.В.	1073
Блохина Ю.В.	1187	Зиганшин О.Р.	1187	Попилюк С.Ф.	1187	Хисамутдинов А.Н.	1063
Боброва З.В.	1139	Золотоверхова Н.И.	1063	Просекова Е.В.	1023	Цикуниб А.А.	1179
Бодиенкова Г.М.	1197	Зурочка А.В.	1043	Проскура А.В.	1115	Чухраев А.М.	1163
Боклаженко Е.В.	1197	Зурочка В.А.	1043	Руденко К.А.	1179	Шепелькова Г.С.	1015
Болотская Л.А.	1055	Иванова Е.В.	1147	Русанова Д.В.	1197	Шумилов Д.С.	1179
Бондарь С.С.	1169	Ильичева Т.Н.	1147	Рыжиков А.Б.	1147	Эргешов А.Э.	1015
Буланович Ю.А.	1147	Илькович М.М.	1081	Сабыныч В.А.	1023	Яблокова Н.В.	1163
Вагапова Г.Р.	1063	Калюжин О.В.	1187	Святченко С.В.	1147	Яблонский П.К.	1099
Вараксин Н.А.	1115	Кноринг Б.Е.	1099	Семаков Г.П.	1063		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптация	1139	костимуляторные факторы	1170	серонегативный ревматоидный	
активность заболевания	1082	лабораторная диагностика	1164	артрит	1073
аллергический ринит	1024	лимфогенное метастазирование	1116	смертность от гриппа	1147
апоптоз лимфоцитов	1100	лимфоциты	1034	субклинический гипотиреоз	1064
атопическая бронхиальная астма ...	1024	макротиротропинемия	1064	субпопуляции лимфоцитов	1188
аутоиммунный тиреоидит	1056, 1064	мезо-диаминопимелиновая		сыворотка крови	1170
аффинная хроматография	1064	кислота	1188	туберкулез	1015
белки адгезии	1170	менингизм	1034	туберкулез легких	1100
B1-, B2-лимфоциты	1073	металлопротеиназы	1127	угроза выкидыша	1180
вакцинация	1015	многоцветный анализ	1082	физическая нагрузка	1139
вирус гриппа	1147	моноциты	1044	функция нейтрофилов	1188
ГАМК	1139	мурамилпептиды	1188	хроническая пиодермия	1188
гель-фильтрационная		наведенный врожденный		хроническая ртутная	
хроматография	1064	иммунитет	1015	интоксикация	1198
гиперлипидемия	1044	начальные проявления		хронический полипозный	
глаукома	1164	недостаточности кровоснабжения		риносинусит	1156
глутамат	1139	мозга	1044	хронический риносинусит	1156
группы риска	1147	нейротропные антитела	1198	центральные и периферические	
гуморальный иммунитет	1015, 1056	нейтрофилы	1127	проводящие пути нервной системы...	1198
дети	1024, 1034	нейтрофильные внеклеточные		цервикальная интраэпителиальная	
заболеваемость	1164	ловушки	1127	неоплазия	1127
защитные титры антител	1147	неспецифический эффект	1015	цереброспинальная жидкость	1034
иммунная система	1198	ОРВИ	1034	цитокины	1116, 1127, 1156
иммунный ответ	1100	поликлональные активаторы	1116	электронейромиографическое	
иммуноглобулины	1188	популяционный иммунитет	1147	исследование	1198
иммунокомпетентные клетки	1170	потомки	1056	эндотелиальная дисфункция	1044
иммунокомпетентные клетки крови ..	1116	прогнозирование	1164	В-лимфоциты	1082
иммуномодулятор	1188	проточная цитометрия	1034, 1073, 1082	BCG	1015
иммунофенотипирование	1034	рак молочной железы	1116	IL-12B (A1188C, rs3212227)	1180
инвазивная карцинома молочной		рак шейки матки	1127	IL-17A (G197A, rs2275913)	1180
железы неспецифического типа	1116	реакция торможения		IL-1ra	1156
интерлейкин-17A	1024	гематоглиниции	1147	IL-1β (C511T, rs16944)	1180
интерлейкин-17F	1024	родители	1056	IL-1β	1156
интерлейкины	1156, 1164	саркоидоз	1082	IL-4 (C589T, rs2243250)	1180
инфекция кожи	1188	сахарный диабет 1 типа	1056	SNPs генов цитокинов	1180
ишемическая болезнь сердца	1170	семейные случаи аутоиммунных		T-хелперы 17	1024
клиническая эффективность	1188	заболеваний	1056	TNFα (G308A, rs1800629)	1180
костимулирующие молекулы	1073				

«Аллергологи – Иммунологи» «Иммунологи – Аллергологи»

- Организаторы:
 - Российская Ассоциация Аллергологов и Клинических Иммунологов
 - Российское научное общество иммунологов
- Владелец Портала – Санкт-Петербургское Региональное Отделение Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов

Аллергологи-Иммунологи

[Войти](#) или [Зарегистрироваться](#)

[Главная](#) [Группы](#) [Участники](#) [Школы](#) [Конференции](#) [Журналы](#) [Книги](#) [Галерея](#) [О нас](#) [Помощь](#)

[Все](#) [ТОР](#)

[Хорошие](#)

Поиск

X ВСЕРОССИЙСКАЯ ШКОЛА ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ». ТЕМАТИКА «ИНФЕКЦИОННАЯ ИММУНОЛОГИЯ»

Скачать: Информационное письмо , PDF, 500kB Обновленная программа от

XI ВСЕРОССИЙСКАЯ ШКОЛА ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

ШКОЛЫ

Прямой эфир

[Публикации](#) [Комментарии](#)

[Лубяко Елена](#) → [VIII Всероссийская школа по клинической иммунологии «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»](#) 4 в Школы

[Наталья Темникова](#) → [День 1. Лекции с IV школы по клинической иммунологии](#), 6 в Школы

[Лабис Варвара](#) → [VII Всероссийская школа по клинической иммунологии «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»](#) 5 в Школы

[Осипова Антонина](#) → [Способ лечения аллергии - нужно мнение](#) 15 в Лечение аллергии

[Рыжко Оксана](#) → [Многоступенчатый диагностический протокол скрининга пациентов на наличие первичного иммунодефицита, разработанный для врачей-неиммунологов \(обновление от 2011 г.\)](#)* 3 в Первичные иммунодефициты

[Калашникова Татьяна](#) → [VI ВСЕРОССИЙСКАЯ ШКОЛА ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ](#) 1 в Школы

[Калашникова Татьяна](#) → [ДЕНЬ 5. ЛЕКЦИИ С IV ШКОЛЫ ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ](#), 3 в Школы

[Калашникова Татьяна](#) → [Новости о журнале "Инфекция и иммунитет"](#) 1 в Новости сайта

[лабзова алла](#) → [Инфекция и иммунитет, 2011, т.1, №1](#) 3 в Журналы

[Калашникова Татьяна](#) → [Презентация А.А.Тотолына по иммунокорректирующей](#)

- Портал предназначен для ученых, врачей, преподавателей, аспирантов и студентов, работающих в области аллергологии, фундаментальной и клинической иммунологии и интересующихся последними новостями в перечисленных областях.
- Основные задачи портала — создать среду для распространения профессиональных знаний и данных, а также помогать коллегам в их работе.
- С его помощью можно:
 - создать персональную научную страницу на русском языке
 - искать специалистов «узкого профиля»
 - работать с профильными русскоязычными научными журналами
 - обмениваться научными и информационными материалами
 - общаться с коллегами
 - вести научные, образовательные и организационные проекты

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

