

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

Том 22, № 1. С. 1-200

2020

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ОКТАГАМ

Иммуноглобулин человека нормальный

ОКТАГАМ® 10%

Иммуноглобулин человека нормальный



Опыт и доверие

- Доказанная клиническая эффективность и переносимость¹
- Концентрация препарата 10% позволяет уменьшить объем вводимого раствора²
- Высокая скорость – до 0,12 мл/кг/мин позволяет сократить время инфузии³

Представительство в России:

Представительство АО Октафарма Нордик АБ, Швеция 119002 Москва, Денежный пер., 11, стр. 1

Тел.: +7 (495) 785 45 55

Факс: +7 (495) 785 45 58

www.octapharma.ru

octapharma®

За безопасное и оптимальное использование белков человека

1. Robak T et al. Hematology 2010; Vol 15, No 5:351-359. 2. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению больных первичными иммунодефицитами с нарушением гуморального звена. Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов. М., 2014. 35 с. 3. Chérin P & Cabane J. Biodrugs 2010; 24:211-223. Номер РУ препарата Октагам в РФ П N001977/01. Номер РУ препарата Октагам® 10% в РФ ЛП-000300; 1.ИМ.18/07/RUS.

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

январь-февраль

2020, том 22

№ 1

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

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

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

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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 17.01.2020 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1001

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.

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

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

January-February

2020, volume 22

No. 1

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

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, Mal'yi ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 17.01.2020. 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

Boris V. Pinegin – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnostics 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

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.

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Журавлева Ю.А., Черешнев В.А.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ-МУСОРЩИКОВ У ЧЕЛОВЕКА 7

Сенникова С.В., Топтыгина А.П.

СЕМЕЙСТВО ИНТЕРЛЕЙКИНА-36 КАК НОВЫЙ РЕГУЛЯТОР ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА В БАРЬЕРНЫХ ТКАНЯХ..... 49

Нероев В.В., Балацкая Н.В., Ченцова Е.В., Шамхалова Х.М.

МЕХАНИЗМЫ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ И ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ ПЕРЕСАДКАХ РОГОВИЦЫ..... 61

Оригинальные статьи

Айрапетов М.И., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д.

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ T_H1-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИЗМЕНЯЕТСЯ В ЭМОЦИОГЕННЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ И ПРИ ОТМЕНЕ ЭТАНОЛА 77

Борщев Ю.Ю., Буровенко И.Ю., Карасева А.Б., Минасян С.М., Борщев В.Ю., Семенова Н.Ю., Борщева О.В., Половинкин В.В., Родионов Г.Г., Суворов А.Н., Галагудза М.М.

МОДЕЛИРОВАНИЕ СИНДРОМА СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ХИМИЧЕСКОЙ ИНДУКЦИЕЙ ТРАВМЫ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА У КРЫС..... 87

Поромов А.А., Махмудова Н.Р., Фалынскова И.Н., Глубокова Е.А., Карташова Н.П., Федякина И.Т., Свитич О.А., Ленёва И.А.

ПАТОГЕНЕЗ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ, ИНДУЦИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ПОДТИПАМИ ВИРУСА ГРИППА А, У МЫШЕЙ 99

Крышень К.Л., Кухаренко А.Е., Вичаре А.С., Гайдай Е.А., Крышень А.А., Гуцин Я.А., Калюжин О.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г., Махадеван Б.

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИЗАТА НА МОДЕЛЯХ АСЕПТИЧЕСКОГО ЛИМФАДЕНИТА И ПНЕВМОКОККОВОЙ ПНЕВМОНИИ IN VIVO 111

Луговая А.В., Калинина Н.М., Митрейкин В.Ф., Эмануэль Ю.В., Ковальчук Ю.П., Артемова А.В.

СПОНТАННЫЙ И ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ПАТОГЕНЕЗЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА 123

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

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА КОСТНОМОЗГОВЫЕ МОНОНУКЛЕАРЫ 135

Кудряшова А.М., Нестеренко Л.Н., Генералова Г.А., Абасеева Т.Ю., Михайлова Н.А., Борисова О.В.

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИТЕЛ К ЭРИТРОПОЭТИНУ У ПАЦИЕНТОВ, ПРОХОДЯЩИХ ТЕРАПИЮ ПРЕПАРАТАМИ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭРИТРОПОЭТИНА..... 143

Краткие сообщения

Панфилов А.Б., Пестова И.В.

ЛИМФОИДНАЯ ТКАНЬ СТЕНКИ ТОНКОЙ И ТОЛСТОЙ КИШОК У АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ (NEOVISON VISON)..... 153

Макарова О.В., Постовалова Е.А., Гао Ю., Добрынина М.Т.

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ 157

Куртасова Л.М., Шакина Н.А., Лубнина Т.В.

ИЗУЧЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ ИММУНОФЕНОТИПА И ПОКАЗАТЕЛЕЙ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ГИПЕРТРОФИЕЙ ГЛОТОЧНОЙ МИНДАЛИНЫ 165

Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Воронина Е.Н., Колпинский Г.И., Луценко В.А., Брежнева Е.В., Костянко М.В., Вафин И.А., Глушков А.А.

АССОЦИИ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ С ПОЛИМОРФНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ 171

Сорокина Л.Н., Минеев В.Н., Еремеева А.В., Нёма М.А.

ФЕНОТИП БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ С «СИНДРОМОМ T-bet»..... 181

Иммунологические методы

Трофимов А.В., Атанесян В.А., Ищенко А.М., Карабанова Е.А., Рак А.Я., Симбирцев А.С., Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д., Ульянова Л.И., Климова Т.А.

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К МОРФИН-СПЕЦИФИЧЕСКИМ ИММУНОГЛОБУЛИНАМ..... 187

Правила для авторов 197

Авторский указатель 200

Предметный указатель 200

CONTENTS

Reviews

Gusev E.Yu., Zotova N.V., Zhuravleva Yu.A., Chereshnev V.A.

PHYSIOLOGICAL AND PATHOGENIC ROLE OF SCAVENGER RECEPTORS IN HUMANS 7

Sennikova S.V., Toptygina A.P.

INTERLEUKIN-36 FAMILY AS A NOVEL REGULATOR OF INFLAMMATION IN THE BARRIER TISSUES..... 49

Neroev V.V., Balatskaya N.V., Chentsova E.V., Shamkhalova Kh.M.

MECHANISMS OF IMMUNE REGULATION AND TRANSPLANTATION IMMUNITY IN CORNEAL TRANSPLANTS 61

Original articles

Airapetov M.I., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D.

EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN EMOTIOGENIC STRUCTURES OF RAT BRAIN IS CHANGED UNDER LONG-TERM ALCOHOL CONSUMPTION AND ETHANOL WITHDRAWAL..... 77

Borshchev Yu.Yu., Burovenko I.Yu., Karaseva A.B., Minasyan S.M., Borshchev V.Yu., Semenova N.Yu., Borshcheva O.V., Polovinkin V.V., Rodionov G.G., Suvorov A.N., Galagudza M.M.

MODELING OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME BY CHEMICAL INDUCTION OF COLON INJURY IN RATS..... 87

Poromov A.A., Makhmudova N.R., Falynskova I.N., Glubokova E.A., Kartashova N.P., Fedyakina I.T., Svitich O.A., Leneva I.A.

INFLUENZA VIRUS INFECTION AND POST-VIRAL BACTERIAL PNEUMONIA PATHOGENESIS INDUCED BY DIFFERENT SUBTYPES OF INFLUENZA VIRUS IN MICE 99

Kryshen K.L., Kukharensko A.E., Vichare A.S., Gaidai E.A., Kryshen A.A., Gushchin Ya.A., Kalyuzhin O.V., Makarova M.N., Makarov V.G., Mahadevan B.

ANTI-INFLAMMATORY AND IMMUNOMODULATING EFFECTS OF THE BACTERIAL LYSATE IN THE *IN VIVO* MODELS OF ASEPTIC LYMPHADENITIS AND PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA..... 111

Lugovaya A.V., Kalinina N.M., Mitreikin V.Ph., Emanuel Yu.V., Kovalchuk Yu.P., Artyomova A.V.

SPONTANEOUS AND ACTIVATION-INDUCED APOPTOSIS OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN THE PATHOGENESIS OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS 123

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

EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS 135

Kudryashova A.M., Nesterenko L.N., Generalova G.A., Abaseeva T.Yu., Mikhailova N.A., Borisova O.V.

CHARACTERISTICS OF ERYTHROPOIETIN ANTIBODIES IN PATIENTS TREATED WITH RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN 143

Short communications

Panfilov A.B., Pestova I.V.

LYMPHOID TISSUE PATTERN IN THE WALLS OF SMALL AND LARGE INTESTINES IN AMERICAN MINK (*NEOVISON VISON*)..... 153

Makarova O.V., Postovalova E.A., Gao Yu., Dobrynina M.T.

SEX DIFFERENCES OF SUBPOPULATION COMPOSITION OF LYMPHOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD IN EXPERIMENTAL ACUTE AND CHRONIC ULCERATIVE COLITIS..... 157

Kurtasova L.M., Shakina N.A., Lubnina T.V.

STUDIES ON CORRELATIONS BETWEEN IMMUNOPHENOTYPE AND THE INDICES OF METABOLIC ENZYME ACTIVITY OF BLOOD LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH HYPERTROPHY OF THE PHARYNGEAL TONSILS..... 165

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

ASSOCIATION OF ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE WITH GENE POLYMORPHISMS OF CYTOKINES IN POSTMENOPAUSAL WOMEN..... 171

Sorokina L.N., Mineev V.N., Ereemeeva A.V., Nyoma M.A.

T-bet SYNDROME-ASSOCIATED BRONCHIAL ASTHMA PHENOTYPE 181

Immunological methods

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

PREPARATION OF POLYCLONAL AND MONOCLONAL ANTIIDIOTYPIC ANTIBODIES AGAINST MORPHINE-SPECIFIC IMMUNOGLOBULINS 187

Instructions to Authors 197

Author index 200

Subject index 200

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ-МУСОРИЩИКОВ У ЧЕЛОВЕКА

Гусев Е.Ю.¹, Зотова Н.В.^{1,2}, Журавлева Ю.А.¹, Черешнев В.А.¹

¹ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

² ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Рецепторы мусорщики — SR (scavenger receptor) включают более 30 отдельных представителей, разделенных по структурному принципу на 11 классов (A–L). Они экспрессируются преимущественно на стромальных макрофагах, их экспрессия на клетках может увеличиваться в прямой зависимости от концентрации их лигандов. По своему строению SR гетерогенны, но их объединяет общая функциональная направленность. Так, различные классы SR могут участвовать в поглощении модифицированных липопротеинов низкой плотности, гликированных белков, апоптотных, стареющих и поврежденных клеток, измененных эритроцитов и тромбоцитов, а также большого числа других эндогенных лигандов из разряда метаболического и клеточного «мусора». Также общим свойством SR является их участие в удалении из кровотока и других тканей относительно небольших количеств патогенов, регулирование процессов клеточного и тканевого стресса, способность образовывать сложные рецепторные комплексы с другими типами рецепторов, включая интегрины и Toll-подобные рецепторы. В отличие от классических паттерн-распознающих рецепторов (PPR), задействование SR не всегда приводит к выраженной активации клеток и развитию провоспалительного клеточного стресса. Функциональные эффекты SR обеспечивают взаимосвязь различных физиологических процессов с иммунной системой, включая процессы нейроэндокринной и метаболической регуляции. Эти механизмы не только обеспечивают стабильность гомеостаза, но также лежат на границе нормы и патологии, участвуя в патогенезе переходных состояний, а также в процессах физиологического старения. Одновременно с этим связанные с SR процессы являются одними из ключевых факторов патогенеза различных соматических заболеваний, в том числе ассоциированных с хроническим воспалением низкой интенсивности, включая ожирение, диабет 2-го типа, атеросклероз, гипертонию, различные варианты нейродегенерации. Также SR вовлечены в процессы опухолевой трансформации и противоопухолевого иммунитета, в различные процессы классического воспаления, начиная с презентации антигенов и заканчивая процессами морфофункциональной поляризации макрофагов и Т-клеток в очаге воспаления и иммунокомпетентных органов. SR играют противоречивую роль в развитии острого системного воспаления — главную причину летальных исходов в палатах интенсивной терапии. Целенаправленное воздействие на SR является перспективным направлением терапии очень широкого круга заболеваний, а определение мембранных и растворимых форм SR — методами диагностики и мониторинга многих патологий человека.

Ключевые слова: рецепторы-мусорщики, тканевой стресс, поляризация макрофагов, хроническое воспаление низкой интенсивности, атеросклероз, опухолевые заболевания, нейродегенерация, системное воспаление

Адрес для переписки:

Зотова Наталья Владимировна
ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (343) 374-00-70.
E-mail: zotovanat@mail.ru

Address for correspondence:

Zotova Natalia V.
B. Eltsin Ural Federal University
620049, Russian Federation, Ekaterinburg,
Pervomayskaya str., 106.
Phone: 7 (343) 374-00-70.
E-mail: zotovanat@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Ю. Гусев, Н.В. Зотова, Ю.А. Журавлева,
В.А. Черешнев «Физиологическая и патогенетическая
роль рецепторов-мусорщиков у человека»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1.
С. 7–48. doi: 10.15789/1563-0625-PAP-1893
© Гусев Е.Ю. и соавт., 2020

For citation:

E.Yu. Gusev, N.V. Zotova, Yu.A. Zhuravleva, V.A. Chereshev
“Physiological and pathogenic role of scavenger receptors
in humans”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 7–48.
doi: 10.15789/1563-0625-PAP-1893
DOI: 10.15789/1563-0625-PAP-1893

PHYSIOLOGICAL AND PATHOGENIC ROLE OF SCAVENGER RECEPTORS IN HUMANS

Gusev E.Yu.^a, Zotova N.V.^{a,b}, Zhuravleva Yu.A.^a, Chereshev V.A.^a

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

^b B. Eltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The scavenger receptors (SRs) include > 30 different molecules structurally classified into 11 classes (A to L). They are expressed mostly on stromal macrophages, and their expression may be augmented in direct dependence with concentrations of their ligands. The SRs are heterogenous by their structure, however, being common in their functional potential. E.g., different SR classes may participate in absorption of modified low-density lipoproteins and glycated proteins, apoptotic and ageing cells, altered erythrocytes and platelets, like as a big variety of other endogenous ligands from metabolic and cellular “trash”. A common property of SRs is their participation in removal of small pathogen amounts from blood circulation, regulation of cell and tissue stress responses, ability to form complicated receptor complexes with other receptor types including integrins and toll-like receptors. Opposite to classic pattern-recognizing receptors, the SR involvement does not always elicit a pronounced cellular activation and development of pro-inflammatory cellular stress. The SR functional effects provide interactions between different physiological events and immune system, including the processes of neuroendocrine and metabolic regulation. These mechanisms provide both homeostatic stability and, likewise, act at the border of normal and pathological conditions, i.e., participating in pathogenesis of transitional processes, e.g., physiological ageing. Moreover, the SR-associated processes represent a key pathogenetic factor in different somatic diseases, e.g., those associated with low-intensity chronic inflammation, including obesity, type 2 diabetes, atherosclerosis, arterial hypertension, various neurodegenerative disorders. Similarly, the SRs are involved into the processes of cancer transformation and antitumor response, different processes of classical inflammation, from antigen presentation to the morphofunctional T cell and macrophage polarization in the inflammation foci and immunocompetent organs. SR are playing a controversial role in development of acute systemic inflammation, the main reason for lethal outcomes in the intensive care wards. Targeted effects upon the SRs represent a promising approach when treating a broad variety of diseases, whereas detection of membrane-bound and soluble SR forms could be performed by means of diagnostic and monitoring techniques in many human disorders.

Keywords: scavenger receptors, tissue stress, polarization of macrophages, low-grade chronic inflammation, atherosclerosis, tumor diseases, neurodegeneration, systemic inflammation

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (регистрационный номер НИОКТР № АААА-А18-118020590108-7).

Рецепторы-мусорщики — SR (scavenger receptor) — были открыты четыре десятилетия назад в качестве структур, ответственных за поглощение макрофагами модифицированных липопротеинов низкой плотности — LDL (low-density lipoproteins) — и превращение макрофагов в пенистые клетки атеросклеротических бляшек. Затем было выявлено, что эти рецепторы выполняют очень широкий спектр общих и специфических функций, которые реализуются как в физиологических условиях, так и при патологии.

Так, в 1979 г. впервые была описана функция макрофагальных рецепторов, участвующих в поглощении ацетилированных липопротеинов низкой плотности (acLDL) [24, 75]. Позднее стало очевидно, что SR могут участвовать в поглощении и окисленных LDL (oxLDL), а также

большого числа других эндогенных лигандов из разряда метаболического мусора, а кроме того, апоптотных, стареющих и поврежденных клеток, измененных эритроцитов и тромбоцитов [28, 174, 205, 212]. Различные типы SR активно вовлекаются в ключевые иммунные процессы, включая процессы презентации антигенов наивным и воспалительным Т-лимфоцитам, классической и альтернативной дифференцировки макрофагов (M) и Т-хелперов (Th), а также в процессы созревания, миграции и реализации эффекторных функций иммунокомпетентных клеток [28, 174]. Дисфункция SR является важным звеном патогенеза острых и хронических соматических заболеваний, включая атеросклероз [21, 205], болезнь Альцгеймера [52], гипертоническую болезнь [109, 176], сахарный диабет [134], злокачественные опухоли [245]. Моделирование активности SR является важной задачей патогенетической терапии опухолевых, аутоиммунных,

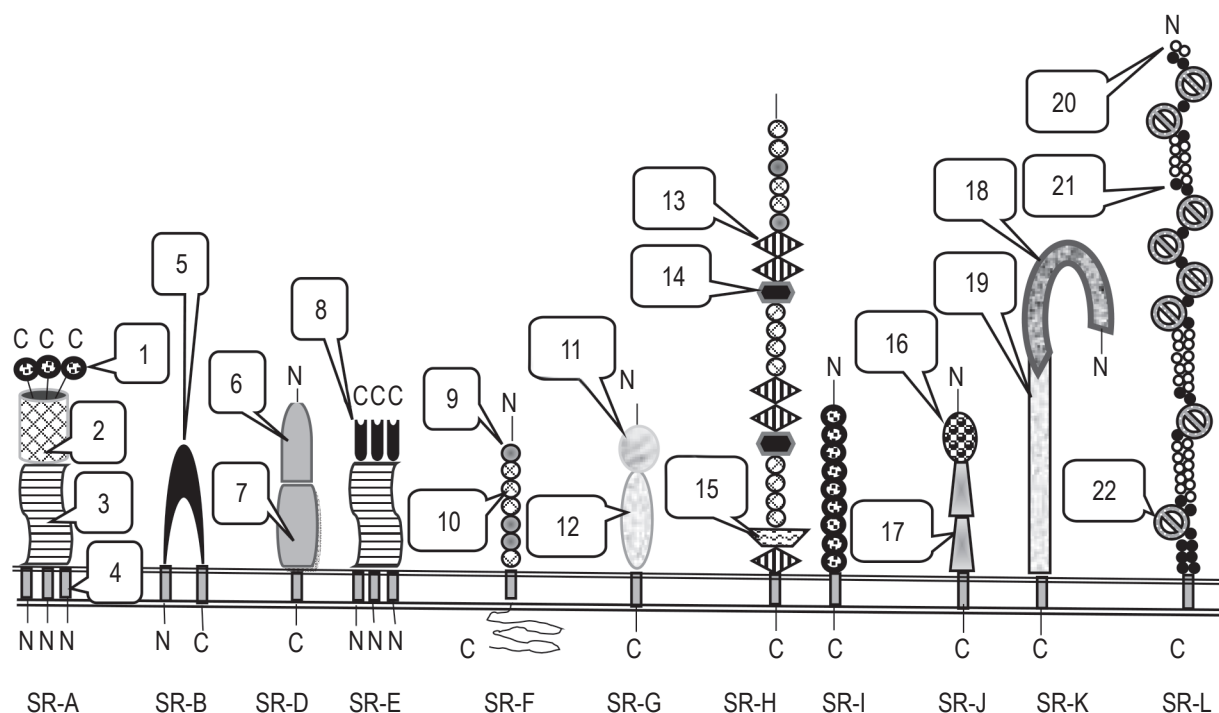


Рисунок. 1. Характерная структура основных классов рецепторов-мусорщиков

Примечание. 1. Scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) – богатый цистеином домен SR. 2. Collagenous – коллагеновый домен. 3. Helical coiled-coil – домен в виде спиральной катушки. 4. Transmembrane – трансмембранный домен. 5. CD36-домен. 6. Mucin – муциновый домен. 7. LAMP (lysosome-associated membrane protein) – домен мембранного белка лизосом. 8. C-type lectin – лектиноподобный домен C-типа. 9. EGF-like – EGF-подобный домен. 10. EGF – домен эпидермального фактора роста. 11. CXC-chemokine – CXC-хемокиновый домен. 12. Mucin-like – муциноподобный домен. 13. Fasciclin 1 (FAS1) – фасцилин 1 интегральный домен. 14. Laminin-type – домен, характерный для экстраклеточного белка ламинина. 15. Link – шарнирный домен, подобный доменам C-лектинов, связывающих гиалуроновую кислоту. 16. Variable – домен V-типа суперсемейства иммуноглобулинов. 17. Spacer – домены-прокладки C-типа суперсемейства иммуноглобулинов. 18. Hyaluronan binding – домен (не Link), связывающий гиалуроновую кислоту. 19. Membrane proximal – проксимальный по отношению к мембране домен. 20. Ligand-binding repeat – домены с лиганд-связывающими повторами. 21. EGF-repeat – домены с EGF-образными тандемными повторами. 22. β -propeller – домен с винтообразной бета-складчатостью.

Figure 1. Characteristic structure of the main classes of scavenger receptors

Note. 1. Scavenger receptor cysteine-rich (SRCR). 2. Collagenous, collagen domain. 3. Helical coiled-coil. 4. Transmembrane domain. 5. CD36 domain. 6. Mucin domain. 7. LAMP (lysosome-associated membrane protein). 8. C-type lectin domain. 9. EGF-like domain. 10. EGF, epidermal growth factor domain. 11. CXC-chemokine domain. 12. Mucin-like domain. 13. Fasciclin 1 (FAS1) domain. 14. Laminin-type domain. 15. Link, hinge domain similar to C-lectins domains binding the hyaluronic acid. 16. Variable, V-type domain of immunoglobulin super family. 17. Spacer, C-domain spacers of the immunoglobulin superfamily. 18. Hyaluronan binding domain (do not Link). 19. Membrane proximal domain. 20. Ligand-binding repeat domain. 21. EGF-repeat domain. 22. β -propeller domain.

инфекционных, нейродегенеративных, метаболических и многих других заболеваний человека. Учитывая очень широкий диапазон функций SR, установление протективной и негативной роли этих рецепторов в патогенезе различных соматических заболеваний является актуальной проблемой современной медицины.

Глава 1. Общая характеристика рецепторов-мусорщиков

Молекулярное семейство SR включает более 30 представителей (табл. 1). Все они объединены общими функциональными свойствами, а не структурной гомологией и генетическим происхождением [174, 242]. Рецепторы, гомологичные

по структуре, формируют отдельные классы SR в рамках этого семейства (рис. 1).

Наиболее выраженно экспрессируют SR клетки Купфера (макрофаги синусовых капилляров печени), другие стромальные макрофаги, различные миелоидные клетки, эндотелиоциты, а также некоторые эпителиальные, стромальные и паренхиматозные клетки [28, 245].

Большинство SR связывают многие лиганды, общие для них и классических паттерн-распознающих рецепторов – PRR (pattern recognition receptors). При этом задействование классических PRR вызывает сильную стрессорную реакцию клеток врожденного иммунитета. Ли-

гандами PRR являются типовые, эволюционно консервативные микробные антигены — PAMP (pathogen-associated molecular pattern), включая липополисахарид грамотрицательных бактерий (LPS), а также эндогенные, связанные с повреждением молекулярные паттерны — DAMP (damage-associated molecular pattern) [209]. По-видимому, наиболее известными семействами PRR являются Toll-подобные рецепторы — TLR (Toll-like receptors) и NOD-подобные рецепторы (NLR) [35]. Однако большинство SR, несмотря на способность связывать многие общие с TLR лиганды и отдельные лиганды NLR, не являются классическими PRR, поскольку задействование SR, как правило, не вызывает выраженную активацию клеток.

Различные типы SR вовлекаются в процессы эндоцитоза, фагоцитоза, адгезии и межклеточной сигнализации, способствуют уничтожению деградированных и вредных веществ, а также задействуются в процессе поглощения и представления антигенов дендритными клетками (ДК) [28]. Поглощение инородных и собственных модифицированных веществ осуществляется простым эндоцитозом, а также макропиноцитозом и фагоцитозом, которые требуют сложной трансдукции сигнала внутрь клетки. Информация от SR способна активировать универсальные внутриклеточные сигнальные пути клеточного стресса, связанные с семейством митоген-активируемых протеинкиназ — MAPK (mitogen-activated protein kinases) и транскрипционными факторами семейства NF-κB [245]. Однако связывание SR с лигандами, в отличие от классических PRR, рецепторов комплемента и антителозависимых механизмов фагоцитоза, как уже отмечалось, далеко не всегда приводит к выраженной активации клеток. Более того, задействование SR в ряде случаев (при относительно умеренных концентрациях их лигандов) предотвращает формирование провоспалительного фенотипа клеток [28, 174, 245]. Последнее особенно важно для сохранения гомеостаза при удалении из системного кровотока вредных веществ и aberrантных клеток макрофагами ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС), а также при выполнении своих нормальных функций стромальными макрофагами внутренних органов. Это обстоятельство определяет значение SR для клеточного и метаболического оборота в физиологических условиях. Кроме того, SR участвуют в процессах иммуногенеза и иммунного ответа (в основном в качестве корецепторов) [28, 174].

Широкий диапазон функциональных возможностей SR определяется их разнообразием, способностью связывать рецептором одного типа несколько лигандов, возможностью SR вступить

в кооперативные отношения с рецепторами других семейств (прежде всего, TLR и интегринами), которые связывают одинаковые с SR лиганды или же лиганды, не связываемые SR. При этом на клеточной мембране формируются сложные рецепторные комплексы, в которых SR могут разнонаправленно регулировать функцию других рецепторов, включая их сигнальные пути [28, 223]. Таким образом, SR выполняют функцию корецепторов и/или альтернативных рецепторов. Многие SR могут функционально кооперироваться и с внутриклеточными видами PRR. Так, SR участвуют в интернализации лигандов (в виде комплексов SR-лиганд), а также в их внутриклеточной переработке и в передаче своих лигандов внутриклеточным рецепторам, включая NLR и внутриклеточные виды TLR [28, 174, 245].

Другим общим свойством SR является увеличение их экспрессии при возрастании концентрации их лигандов в окружающей клетку среде. Это может иметь как положительное значение — усиление поглотительной функции макрофагов, так и отрицательное — хронизация тканевого стресса и консервация измененного гомеостаза (аллостаза) на фоне устойчивых нарушений обменных процессов [176, 245].

Удивительно, но, имея большой спектр общих лигандов, различные классы SR имеют совершенно разную структуру — набор доменов различного эволюционного происхождения (рис. 1). Так, одними из самых древних рецепторных доменов, связанных с врожденным иммунитетом, являются структуры суперсемейства молекул, богатых лейцин-повторами, в частности формирующие лиганд-распознающие структуры у TLR и NLR [187]. Однако рецепторная функция этих молекулярных структур для SR пока не описана. Зато в нескольких классах SR выявляются лектин-подобные домены С-типа (характеризуют суперсемейство С-лектинов, основная функция которых — связывание отрицательно заряженных гликанов через кальциевый мостик) [96]. Также у представителей нескольких классов SR выявляются домены, богатые цистеином, — CR (cysteine-rich), которые у SR обозначаются как SRCR [141]. Эти домены широко распространены среди различных рецепторов эукариот [194]. Многие SR имеют углеводные группы с муциноподобной функцией взаимодействия с лектинами, включая селектины, которые, в частности, ответственны за роллинг — начальный этап миграции лейкоцитов через эндотелиальную выстилку [174]. Кроме того, у отдельных классов SR выявляются домены суперсемейства иммуноглобулинов V- и С-типа, а также структуры, гомологичные молекулам семейства фактора роста эпидермиса — EGF (epidermal growth factor) [210] и ряда

ТАБЛИЦА 1. НОМЕНКЛАТУРА, КЛЕТОЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ И ЛИГАНДЫ РЕЦЕПТОРОВ-МУСОРЩИКОВ ЧЕЛОВЕКА

TABLE 1. NOMENCLATURE, CELL EXPRESSION, AND LIGANDS OF HUMAN SCAVENGER RECEPTORS

Ген NCBI Gene in NCBI	№ гена NCBI Gene No. in NCBI	Хромосома № Chromosome No.	Основное название Main name	Другие названия Other names	Основные клетки, экспрессирующие SR Main cells expressing SR	Основные лиганды Ligands
MSR1	4481	8	SR-A1	SR-AI, CD204, SCARA1	Макрофаги, моноциты, M2, ДК, фибробласты, эндотелиоциты, МС, мастоциты [100, 110, 157, 174] Macrophages, monocytes, M2, DC, fibroblasts, endotheliocytes, VM, mast cells [100, 110, 157, 174]	β-амилоид [63], БТШ [17], AGE [162], РАРМ грамположительных [47] и грамотрицательных бактерий [86], dsRNA [157, 172], ДНК [13] и модифицированные LDL (acLDL, oxLDL) [116, 189], полианионы [5, 174], кальципротеины [157, 174] Amyloid β [63], HSP [17], AGE [162], PAMPs of gram-positive [47] and gram-negative bacteria [86], dsRNA [157, 172], DNA [13] and modified LDL (acLDL, oxLDL) [116, 189], polyanions [5, 174], calciproteins [157, 174]
SR-AI*	4481	8	SR-A1.1	SA-AII		
SCARA3	51435	8	SR-A3	MSRL1	Эпителиоциты, фибробласты [87, 227] Epithelial cells, fibroblasts [87, 227]	Модифицированные ROS эндогенные белки, включая oxLDL [87] ROS-modified endogenous proteins, including oxLDL [87]
COLEC12	81035	18	SR-A4	SCARA4, SRCL1/II, CL-P1	Эпителиоциты, фибробласты [103, 156] Epithelial cells, fibroblasts [103, 156]	Модифицированные эндогенные белки, включая гликопротеины, РАРМ [100, 174, 227] Modified endogenous proteins, including glycoproteins, PAMPs [100, 174, 227]
SCARA5	286133	8	SR-A5	TESR, NET33	Эндотелиоциты, эпителиоциты [103] Endotheliocytes, epithelial cells [103]	РАРМ, модифицированные LDL, полианионы [28, 103, 227] PAMPs, modified LDL, polyanions [28, 103, 227]
MARCO	8685	2	SR-A6	SCARA2	Макрофаги, фибробласты [117, 226] Macrophages, fibroblasts [117, 226]	РАРМ, модифицированные LDL, полианионы [28, 118, 157, 227], асбест [154] PAMPs, modified LDL, polyanions [28, 118, 157, 227], asbestos [154]

Ген NCBI Gene in NCBI	№ гена NCBI Gene No. in NCBI	Хромосома № Chromosome No.	Основное название Main name	Другие названия Other names	Основные клетки, экспрессирующие SR Main cells expressing SR	Основные лиганды Ligands
SCARB1	949	12	SR-B1	SR-BI, CD36L1	Гепатоциты, макрофаги, надпочечники, раковые клетки [6, 149] Hepatocytes, macrophages, adrenal glands, cancer cells [6, 149]	HDL, модифициро- ванные HDL, oxLDL, PAMP, микобакте- рии, вирус гепатита С (входные ворота для вируса), полианионы, каротиноиды [6, 149] HDL, modified HDL, oxLDL, PAMPs, mycobacteria, hepatitis C virus (entry gate for the virus), polyanions, carotenoids [6, 149]
CD36	948	7	SR-B2	SCARB3, FAT, GPIV, PAS4	Макрофаги, тромбоциты, гепатоциты, МС, эндотелиоциты, эпителий, эритроциты, адипоциты [28, 202, 238] Macrophages, platelets, hepatocytes, VM, endotheliocytes, epithelium, erythrocytes, adipocytes [28, 202, 238]	Окисленные аце- тилхолин и фосфа- тидилсерин, oxLDL, AGE, β -амилоиды, тромбоспондин, PAMP, полианионы, высшие жирные кис- лоты, коллаген I и IV типа, фибронектин, $\alpha v \beta 3$ -интегрин [28, 40, 202, 238] Oxidized acetylcholine and phosphatidylserine, oxLDL, AGE, β -amyloids, thrombospondin, PAMPs, polyanions, higher fatty acids, type I and IV collagen, fibronectin, $\alpha v \beta 3$ integrin [28, 40, 202, 238]
CD68	968	17	SR-D1	SCARD1, Macrosialin, LAMP4, gp110,	Макрофаги, моноциты, ДК [32, 97] Macrophages, monocytes, DC [32, 97]	oxLDL, Е-селектины (на эндотелии), апоптотические клетки (фосфатидилсерин), модифицированные LDL [32, 97, 127, 174] oxLDL, E-selectins (on the endothelium), apoptotic cells (phosphatidylserine), modified LDL [32, 97, 127, 174]
OLR1	4973	12	SR-E1	LOX-1, SCARE1, CLEC8A	Эндотелиоциты, МС, макрофаги, тромбоциты, фибробласты [14, 174, 205] Endotheliocytes, VM, macrophages, platelets, fibroblasts [14, 174, 205]	oxLDL, AGE, CRP, продукты апоптоза, БТШ, активирован- ные тромбоциты [14, 25, 127, 174, 205] oxLDL, AGE, CRP, apoptosis products, HSP, activated platelets [14, 25, 127, 174, 205]
SRE-1*	4973	12	SR-E1.1	LOXIN		

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

Ген NCBI Gene in NCBI	№ гена NCBI Gene No. in NCBI	Хромосома № Chromosome No.	Основное название Main name	Другие названия Other names	Основные клетки, экспрессирующие SR Main cells expressing SR	Основные лиганды Ligands
CLEC7A	64581	12	SR-E2	Dectin-1, BGR, SCARE2, CD369	Макрофаги, ДК, нейтрофилы [77] Macrophages, DC, neutrophils [77]	РАМР (β-1,3 и / или β1-6 гликаны бактерий и особенно патогенных грибов) [77, 190] PAMPs (β-1,3 and / or β1-6 bacterial glycans and especially pathogenic fungi) [77, 190]
CD206, MRC1	4360	10	SR-E3	Mannose receptor 1	Макрофаги 2-го типа (M2), ДК [142, 188] M2, DC [142, 188]	Микробные гликаны, измененные глико- протеины плазмы крови, коллаген, HSP70 [142, 190, 237] Microbial glycans, altered blood plasma glycoproteins, collagen, HSP70 [142, 190, 237]
ASGPR	432	17	SR-E4	HL-1, CLEC4H1, AMR	Гепатоциты, клетки Купфера [33, 94] Hepatocytes, Kupffer's cells [33, 94]	Лишенные сиаловой кислоты гликопротеи- ны и гликолипиды, измененные тромбо- циты [33, 94] Sialic acid-free glycoproteins and glycolipids, altered platelets [33, 94]
SCARF1	8578	17	SR-F1	SREC-I	Эндотелиоциты, ДК, макрофаги, нейроны, фибробласты, эпителиальные клетки [167, 174, 201] Endotheliocytes, DC, macrophages, neurons, fibroblasts, epithelial cells [167, 174, 201]	Модифицированные LDL, кальций-свя- зывающие белки (адвиллин, кальре- тикулин), грибковые β-гликаны, LPS, dsRNA, липотейхое- вые кислоты, БТШ, C1q, CD4⁺Т-клетки (неизвестный лиганд) [127, 167, 201, 229] Modified LDL, calcium- binding proteins (Advillin, Calreticulin), fungal β-glycans, LPS, dsRNA, lipoteichoic acids, HSP, C1q, CD4 ⁺ T cells (unknown ligand) [127, 167, 201, 229]
SCARF2	91179	22	SR-F2	SREC-II	Эндотелиоциты, макрофаги [102] Endotheliocytes, macrophages [102]	SR-F1, acLDL, C1q, кальретикулин [102, 229] SR-F1, acLDL, C1q, Calreticulin [102, 229]

Ген NCBI Gene in NCBI	№ гена NCBI Gene No. in NCBI	Хромосома № Chromosome No.	Основное название Main name	Другие названия Other names	Основные клетки, экспрессирующие SR Main cells expressing SR	Основные лиганды Ligands
MEGF10	84466	5	SR-F3	EMARDD, Megf10	Микроглия, астроциты, миосателлитные клетки Microglia, astrocytes, myosatellite cells	Фосфатидилсерин апоптотических кле- ток, β-амилоид, C1q- комплемент [101] Apoptotic cell phosphatidylserine, β-amyloid, C1q complement [101]
CXCL16	58191	17	SR-G1	SR-PSOX	Макрофаги, миоциты артерий [28, 224] Macrophages, artery myocytes [28, 224]	Фосфатидилсерин, oxLDL, PAMP, продук- ты апоптоза и клеточ- ного некроза, CXCR6 [28, 48, 127] Phosphatidylserine, oxLDL, PAMPs, products of apoptosis and cell necrosis, CXCR6 [28, 48, 127]
STAB1	608560	3	SR-H1	FEEL-1, stabilin-1	Макрофаги РЭС [7, 68], M2 [122] Macrophages of RES [7, 68], M2 [122]	PAMP грамположи- тельных и грамтри- цательных бактерий, модифицированные LDL, гепарин, гиалу- ронат, фосфатидил- серин [7, 68, 122] PAMPs of gram-positive and gram-negative bacteria, modified LDL, heparin, hyaluronate, phosphatidylserine [7, 68, 122]
STAB2	55576	12	SR-H2	FEEL-2, HARE, stabilin-2	Макрофаги РЭС, эндотелиоциты [68, 166] Macrophages of RES, endotheliocytes [68, 166]	PAMP, модифициро- ванные LDL, гепарин, гиалуронат и некото- рые другие кислые гликаны, нуклеино- вые кислоты, фосфа- тидилсерин [68, 166] PAMPs, modified LDL, heparin, hyaluronate and some other acidic glycans, nucleic acids, phosphatidylserine [68, 166]
CD163	9332	12	SR-I1	M130, CD163A	Макрофаги: РЭС, тимуса, М-(Hb), M2, микроглии, моноци- ты [51, 84, 195] Macrophages: RES, thymus, M-(Hb), M2, microglia, monocytes [51, 84, 195]	Комплексы гемогло- бин-гаптоглобин, низкоаффинно с ге- моглобином, фибро- нектин, PAMP – виру- сов и бактерий [51, 84, 195, 220] Hemoglobin-haptoglobin complexes, low affinity with hemoglobin, fibronectin, viral and bacterial PAMPs [51, 84, 195, 220]

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

Ген NCBI Gene in NCBI	№ гена NCBI Gene No. in NCBI	Хромосома № Chromosome No.	Основное название Main name	Другие названия Other names	Основные клетки, экспрессирующие SR Main cells expressing SR	Основные лиганды Ligands
CD163L1	283316	12	SR-I2	CD163B, M160	Макрофаги, но мало на клетках Купфера [78, 147] Macrophages, but few on Kupffer's cells [78, 147]	Способствует разре- шению воспаления, но не за счет связы- вания лигандов SR-I1 [148] Contributes to the resolution of inflammation, but not due to the binding of SR-I1 ligands [148]
SCART1	619207	10	SR-I3	CD163c	CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells	Корецептор на αβ и γδ Т-клетках [95] Co-receptor on αβ and γδ T cells [95]
RAGE m	177	6	SR-J1	AGER	Макрофаги, ДК, нейроны, гепатоциты, эндотелиоциты, Th1, эпителиоциты, МС, кардиомиоциты [128, 203] Macrophages, DC, neurons, hepatocytes, endotheliocytes, Th1, epithelial cells, VM, cardiomyocytes [128, 203]	AGE, фосфатидил- серин, модифициро- ванные ROS эндо- генные белки, DAMP (S-100, HMGB1), β-амилоиды, амило- идные фибриллы, HSP70, Mac-1 (CD11b/ CD18), коллаген I и IV [67, 127, 128, 162, 203] AGE, phosphatidylserine, ROS-modified endogenous proteins, DAMPs (S-100, HMGB1), β-amyloids, amyloid fibrils, HSP70, Mac-1 (CD11b / CD18), collagen I and IV [67, 127, 128, 162, 203]
RAGE s *	177	6	SR-J1.1	AGER		
CD44	960	11	SR-K1	Pgp-1, HCAM, Ly-24	Хондроциты, раковые клетки, лимфоциты, М, эпителиоциты [115, 192] Chondrocytes, cancer cells, lymphocytes, M, epithelial cells [115, 192]	Гиалуронат, коллаген- ны, матриксные коллагеназы, фибронектин, ламина- нин, Е-селектины, фибрин остеопонтин, металлопротеиназы [115, 192, 198] Hyaluronate, collagens, matrix collagenases, fibronectin, laminin, E-selectins, osteopontin fibrin, metalloproteinases [115, 192, 198]

Ген NCBI Gene in NCBI	№ гена NCBI Gene No. in NCBI	Хромосома № Chromosome No.	Основное название Main name	Другие названия Other names	Основные клетки, экспрессирующие SR Main cells expressing SR	Основные лиганды Ligands
LRP1	4035	12	SR-L1	A2MR, CD91	Клетки Купфера, ДК, гепатоциты, адипоциты, МС, перициты, нейроны, астроциты, фибробласты [59, 129] Kupffer's cells, DC, hepatocytes, adipocytes, VM, pericytes, neurons, astrocytes, fibroblasts [59, 129]	Аполипопротеин Е, oxLDL, комплексы протеиназ с анти- протеиназами, БТШ, некоторые протеина- зы, С1q, интегрины, тромбоспондины, фибронектин, лакто- феррин, амилоидные белки, фрагменты миелина, PDGF, TGF-β, гемопексин- гем [59, 129] Apolipoprotein E, oxLDL, proteinase complexes with antiproteinases, HSP, some proteinases, C1q, integrins, thrombospondins, fibronectin, lactoferrin, amyloid proteins, myelin fragments, PDGF, TGF-β, hemopexin- heme [59, 129]
LRP2	4036	2	SR-L2	Megalin, gp330	Эпителиоциты, нейроны, эмбриоциты [57] Epithelial cells, neurons, embryocytes [57]	Нативные LDL, гепа- рансульфат, регули- рующий морфогенез белок – Shh [57] Native LDL, heparan sulfate, morphogenesis regulating protein – Shh [57]
SRCRB4D	136853	7	нет по	нет по	Эпителиоциты [141, 164] Epithelial cells [141, 164]	РАМР, модифициро- ванные LDL [141, 164] PAMPs, modified LDL [141, 164]
SSC5D	284297	19	нет по	нет по	Макрофаги, Т-лимфоциты [131] Macrophages, T lymphocytes [131]	РАМР грамположи- тельных и грамтри- цательных бактерий [131] PAMPs of gram-positive and gram-negative bacteria [131]
CD14	929	5	нет по	нет по	Макрофаги [124] Macrophages [124]	LPS + LPS- связывающий белок [124], БТШ [12]
Ly75, CD205	4065	2	нет по	нет по	Зрелые ДК, В-лимфоциты [26, 107] Mature DC, B lymphocytes [26, 107]	РАМР (манозосодер- жащие гликаны): HIV, Yersinia pestis, E. coli, апоптотные клетки [26, 107] PAMPs (manose- containing glycans): HIV, Yersinia pestis, E. coli, apoptotic cells [26, 107]

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Ген NCBI Gene in NCBI	№ гена NCBI Gene No. in NCBI	Хромосома № Chromosome No.	Основное название Main name	Другие названия Other names	Основные клетки, экспрессирующие SR Main cells expressing SR	Основные лиганды Ligands
CD207, Langerin	50489	2	нет no	нет no	Клетки Лангерган- са, ДК, эпителио- циты [58] Langerhans' cells, DC, epithelial cells [58]	РАМР (сульфатиро- ванными и манози- лированными гликана- ми), кератан-сульфат, β-гликаны, вирусы HIV-1 и Кори [58, 204, 232] PAMPs (sulfated and manosylated glycans), keratan sulfate, β-glycans, HIV-1 and measles viruses [58, 204, 232]
CD209, DC-SIGN	30835	19	нет no	CLEC4L	Макрофаги, ДК [43, 112] Macrophages, DC [43, 112]	РАМР (маннозосодер- жащие гликаны), ви- русы HIV-1 и гепатита С, гликопротеины [43, 112] PAMPs (mannose- containing glycans), HIV-1 and hepatitis C viruses, glycoproteins [43, 112]

Примечание. NCBI (National Center for Biotechnology Information) – национальный центр биотехнологической информации; Хр. – хромосома; * – наличие альтернативного сплайсинга мРНК; «нет» – рецептор отнесен к категории SR, но его класс не определен. RAGE m и RAGE s – мембранная и растворимая форма рецептора, ДК – дендритные клетки, М-(Hb) – связанные с гемоглобином макрофаги, М2 – макрофаги 2-го типа, МС – миоциты сосудов (VM – vascular myocytes), Th1 – Т-хелперы 1-го типа. Лиганды: AGE – аномальные продукты гликирования, БТШ – белки теплового шока (из семейств: HSP70, HSP90, HSP110), dsRNA – двуцепочечные вирусные РНК, acLDL – ацетилированные липопротеины низкой плотности (LDL), oxLDL – окисленные LDL, HDL – липопротеины высокой плотности, CRP – С-реактивный протеин, HMGB1 – ядерный негистоновый белок с функцией DAMP, S-100 – кальций-связывающие белки с функцией DAMP.

Note. NCBI, National Center for Biotechnology Information; *, availability of alternative mRNA; "no", the receptor is classified as SR, but its class is not defined. RAGE m и RAGE s, membrane and soluble receptor form; DC, dendritic cells; M-(Hb), hemoglobin-related macrophages; M2, type 2 macrophages; VM, vascular myocytes; Th1, T-helper type 1. Ligands: AGE, abnormal glycation products; HSP, heat shock proteins (family: HSP70, HSP90, HSP110); dsRNA, double-stranded viral RNA; acLDL, acetylated low density lipoproteins (LDL); oxLDL, oxidized LDL; HDL, high density lipoproteins; CRP, C-reactive protein; HMGB1, nuclear non-histone protein with function of DAMP; S-100, calcium binding proteins with DAMP function.

других белковых семейств (рис. 1). При этом большинство SR имеют неоднородный по происхождению состав доменов, включая и их лиганд-распознающие структуры. Несмотря на структурную неоднородность, SR различных классов способны выполнять перекрывающиеся функции распознавания поврежденных клеток и эндогенных белков, а также однотипных структур различных патогенов. Это связано с тем, что различные по своей природе SR могут иметь схожие физико-химические свойства. К этим свойствам можно, в частности, отнести [28, 174, 245]:

– повторяющиеся положительно или отрицательно заряженные участки, способные связывать разноименные заряды у рецепторов и их

лигандов или одноименные – отрицательно заряженные группы через кальциевый мостик;

– полярные или, напротив, гидрофобные структуры, способные к взаимодействию с окисленными и аномально гликированными белками, денатурированными белками, многими РАМР и высокомолекулярными (≥ 70 kD) белками теплового шока (БТШ).

Это определяет способности SR [28, 174, 245]:

– связывать общие РАМР, включая липотейхоевые кислоты клеточной стенки грамположительных бактерий, LPS, вирусные двуцепочечные РНК (dsRNA);

– связывать эндогенные ДНК и многие кальций-связывающие белки;

— распознавать на поверхности апоптозных клеток C1q-компонент комплемента и фосфатидилсерин (этот фосфолипид у нормальных клеток локализуется во внутреннем слое мембраны, но переходит в наружный слой у апоптотических и поврежденных клеток), а также ряд других типовых молекулярных признаков повреждения и чужеродности (табл. 1).

Посредством связывания общих лигандов различные SR могут иметь и общую функциональную направленность (принцип избыточности важных функций), например удаление из кровотока продуктов апоптоза, измененных клеток и высокомолекулярных метаболитов (прежде всего, белков), а также ограниченного количества микробных патогенов. Одновременно с этим индивидуальные SR имеют функциональные особенности на уровне запускаемых ими сигнальных путей, иных внутриклеточных функций, способности к кооперации с другими типами рецепторов, а также особенности экспрессии на тех или иных клеточных популяциях и субпопуляциях, наличия не только общих, но и специфических лигандов. Как и многие другие рецепторы, SR могут образовывать растворимые формы, которые выполняют самостоятельные функции.

Таким образом, общими свойствами и функциями SR являются [28, 174, 245]:

- преимущественная экспрессия на макрофагах;
- утилизация эндогенных измененных клеточных и белковых структур;
- участие в поддержании гомеостаза в физиологических условиях;
- удаление из кровотока и внутренних органов относительно небольших количеств патогенов и продуктов их деградации до развития воспаления;
- вспомогательное участие в антимикробной активности воспалительных макрофагов;
- участие в процессах клеточной миграции, адгезии и дифференцировки;
- обеспечение и регуляция процессов презентации антигенов ДК;
- наличие растворимых форм при активации этих рецепторов;
- увеличение клеточной экспрессии в прямой зависимости от концентрации их лигандов;
- SR, как правило, могут эффективно функционировать только в условиях образования олигомерных структур с однотипными рецепторами или при формировании гетеромультимерных комплексов с рецепторами других семейств.

Имея широкий спектр функций, SR вовлекаются не только в физиологические, но и в различные дисфункциональные системы, опреде-

ляющие патогенез различных инфекционных, аллергических, аутоиммунных и опухолевых заболеваний. Эти патологии связаны с иммунной дисфункцией и неадекватностью воспалительного процесса. Так, в настоящее время очевидно, что дисфункция SR связана с развитием хронического воспаления низкой интенсивности (chronic low-grade inflammation), лежащего в основе патогенеза ожирения и сахарного диабета 2-го типа, атеросклероза, гипертонической болезни, различных нейродегенеративных заболеваний, неалкогольной жировой болезни печени и ряда других хронических соматических болезней [62, 171].

Глава 2. Характеристика отдельных классов рецепторов-мусорщиков

В 2017 г. была принята новая система стандартизации SR [174]. У человека были стандартизованы более тридцати рецепторов этого семейства (табл. 1). При этом SR были разделены на 11 классов (A-L), исходя из особенностей их строения (рис. 1), а именно: SR-A (1, 3, 4, 5, 6 + A1.1 — альтернативный сплайсинг SR-A1); SR-B(1-2); SR-D (1); SR-E (1-4 + SR-E1.1); SR-F (1-3); SR-G1; SR-H (1-2); SR-I (1-3); SR-J (1 + SR-J1.1); SR-K (1); SR-L (1-2), в скобках даны диапазоны номеров отдельных рецепторов или обозначается подкласс (буквами и цифрами) при наличии альтернативного сплайсинга мРНК. Шесть SR человека в настоящее время не классифицированы: SRCRB4D, SSC5D, CD14, Ly75 (CD205), Langerin (CD207) и DC-SIGN (CD209) [174] (табл. 1). Каждый класс SR характеризуется относительной однотипностью химической структуры входящих в него рецепторов (рис. 1) [100]. Однако функция и клеточная локализация отдельных SR внутри классов могут существенно отличаться. Одновременно с этим ряд типовых для большинства SR функций может иметь зоны перекрытия у представителей разных классов.

2.1. Класс SR-A

Рецепторы этого класса имеют широкий спектр лигандной специфичности (табл. 1), что вовлекает SR-A в реализацию различных функций в норме и при патологии [174]. В то время как SR-A1 и SR-A6 в основном обнаруживаются на стромальных макрофагах [116, 227], экспрессия других SR-A (3-5) больше выражена на других типах клеток, включая эпителиальные клетки (табл. 1) [103, 156]. При этом рецептор SR-A2 у человека отсутствует.

Типичное для SR-A расположение доменов (рис. 1) имеют только SR-A1, SR-A5 и SR-A6 (у SR-A1.1 нет одного SRCR домена из трех) [227]. Между тем у SR-A3 отсутствуют все 3 домена SRCR, а у SR-A4 все они заменены лектиноподобными доменами C-типа [227]. Домены SRCR,

наряду с коллагеновыми доменами, отвечают за связывание PAMP, включая липотейхоевые кислоты [47] и LPS [86], а также эндогенных лигандов (табл. 1). Коллагеновые домены, как и SRCR, могут связывать модифицированные LDL и некоторые полианионы, например мембранных структур поврежденных и апоптозных клеток [227].

Рецепторы SR-A участвуют в адгезии макрофагов к модифицированному коллагену и протеогликанам экстраклеточного матрикса в очаге воспаления [117]; могут связывать и интернализировать посредством пиноцитоза dsRNA ретровирусов, включая вирус гепатита С и вирус иммунодефицита человека (HIV), после чего обеспечивают во внутриклеточной среде взаимодействие dsRNA с TLR3, необходимое для последующего развития противовирусного ответа клетки [157, 211]. При этом за связывание чужеродных и аутогенных нуклеиновых кислот отвечают коллагеновые домены SR-A, а не SRCR [13].

Рецептор SR-A1 (CD204) распознает различные эндогенные и экзогенные лиганды (табл. 1), включая инородные тела (кремнезем) [110]. Он участвует в распознавании и поглощении макрофагами метаболического мусора и апоптотических клеток или их фрагментов, активируя сигнальные пути тирозинкиназы MERTK [214]. Кроме того, SR-A1 может взаимодействовать с TLR4 в присутствии их общего лиганда — LPS — и активировать в этом случае провоспалительный транскрипционный фактор NF-κB [241]. Этот механизм может иметь отрицательное значение при экспериментальном сепсисе (каловом перитоните у мышей), способствуя системному воспалительному ответу и гибели экспериментальных животных [45, 163]. Однако, по другим данным, у макрофагов SR-A1 может конкурентно блокировать связывание LPS с TLR4 [159], а также, вне зависимости от связывания LPS, блокировать активацию NF-κB в ДК, вызванную TLR4 [243]. Вероятно, направленность этих противоречивых эффектов SR-A1 зависит от концентрации лиганда, особенностей рецепторного комплекса и стадии инфекционного процесса.

На клетках микроглии SR-A1 опосредует связывание β-амилоидных фибрилл и отвечает за предотвращение накопления амилоида в мозге при нейродегенеративных процессах, а у альвеолярных макрофагов снижает выраженность оксидантного стресса, что уменьшает вероятность вторичного повреждения при травме легкого [110]. В целом SR-A1, в зависимости от вида и концентрации лиганда, а также взаимодействия с другими типами PRR, может способствовать как провоспалительному, так и противовоспалительному эффекту [28, 110]. Однако SR-A1

отвечает, главным образом, за гомеостатические функции и только как кофактор в распознавании патогенов [168].

Рецептор SR-A3 особенно активно участвует в клиренсе модифицированных активными формами кислорода (ROS, reactive oxygen species) аутогенных молекул и клеток [87].

Рецепторы SR-A4 и SR-A5, помимо удаления метаболического и клеточного мусора, в принципе способны также связывать некоторые PAMP в системе *in vitro*, но их участие в фагоцитозе микробов в системе *in vivo* не доказано [103, 156].

Рецептор SR-A6 (MARCO), прежде всего, участвует в фагоцитозе патогенов и стимуляции продукции провоспалительных цитокинов [11]. Кроме того, SR-A6 альвеолярных макрофагов может связывать асбест, способствуя фиброзу легкого и поляризации этих макрофагов в направлении функционального полюса M2 [154].

В целом рецепторы SR-A (прежде всего, SR-A1) вносят определяющий вклад в процесс интернализации модифицированных LDL. В то время как функция поглощения апоптотических и aberrантных клеток, а также патогенов распределена между классами SR более равномерно [174, 245].

2.2. Класс SR-B

Задействование этих рецепторов на поверхности клеток может привести к различным последствиям в зависимости от лиганда, типа клетки (табл. 1) и его взаимодействия с другими рецепторами.

Так, SR-B1 отвечает за следующие функции [5, 149, 152]:

- обеспечивает поглощение гепатоцитами, эндокриноцитами коры надпочечников и пролиферирующими клетками липопротеинов высокой плотности HDL (high density lipoproteins), которые являются донорами фосфолипидов, а также участвуют в обмене холестерина;
- способствует пролиферации эпителиоцитов и росту опухолевых клеток;
- участвует в поглощении гепатоцитами oxLDL и oxHDL;
- вовлекается в фагоцитоз макрофагами микобактерий и некоторых других патогенов;
- у гепатоцитов является «входными воротами» для вируса гепатита С.

Рецептор SR-B1 препятствует формированию провоспалительного фенотипа у макрофагов, обработанных LPS, а также снижает выраженность системного воспалительного ответа и способствует выживанию экспериментальных мышей при сепсисе [110]. Кроме того, у мышей с дефицитом SR-B1 в коре надпочечников нарушалась секреция глюкокортикоидов и при воздействии LPS у этих мышей наблюдается более выражен-

ный системный воспалительный ответ [72]. Еще одним протективным механизмом SR-B1 при сепсисе (у мышей) является зависимое от этого рецептора поглощение LPS печеночными макрофагами без существенного повышения провоспалительной активности РЭС [81].

SR-B2 (CD36) могут образовывать рецепторные комплексы с β 1-, β 2-, β 5-интегринами, с наружными видами TLR (TLR2, TLR4, TLR6), Fc-рецепторами к антителам — IgG (Fc γ R), тетраспанинами CD9 и CD81 [28, 90, 207], а также формировать гомодимеры из двух CD36 [184]. Эти взаимодействия реализуются после связывания SR-B2 с PAMP, фосфатидилсерином и окисленным ацетилхолином мембран, oxLDL и другими лигандами (табл. 1). Наличие как специфических, так и общих лигандов всех этих рецепторов определяет характер сформированного рецепторного комплекса.

В большинстве случаев участие CD36 вызывает активацию тирозиновых киназ, таких как FYN и/или LYN, способствуя развитию оксидантного стресса (через активацию NADPH-оксидазы) и перестройке цитоскелета (полимеризацию актина). Также, в ответ на свои лиганды, включая β -амилоид и тромбоспондин-1, CD36 способствует развитию клеточного стресса посредством активации нескольких представителей киназ семейства MAPK из всех трех их основных подсемейств: p38, JNK (Jun N-терминальные киназы) и ERK (extracellular signal-regulated kinases) [78, 203, 238]. В совокупности это индуцирует перестройку актина и стимулирует выработку провоспалительных цитокинов и проапоптотических сигналов. Образование гетеромультимерного рецепторного комплекса CD36 (в качестве корецептора) с TLR способствует формированию провоспалительного фенотипа клеток через активацию зависимых от NF- κ B и других сигнальных путей, запускаемых MyD88 (адаптерный белок, связанный со всеми наружными видами TLR) и отдельными протеинкиназами семейства Src (особенно Lyn) и тирозинкиназой Syk [78, 202, 238]. В частности, было установлено, что CD36 инициирует сборку гетеродимера TLR4-TLR6 [207]. При этом формируется комплекс CD36-TLR4-TLR6 и сигнальный путь, с помощью которого атерогенные липопротеины и β -амилоиды вызывают асептическую провоспалительную реакцию макрофагов (β -амилоиды в клетках микроглии при нейродегенерации).

Модифицированные LDL захватываются CD36 на поверхности макрофагов, инициируя сигнальные каскады, включая активацию киназ (ERK5, MEKK2, JNK1/2) и NF- κ B, которые опосредуют поглощение oxLDL, индуцируют синтез провоспалительных цитокинов и регулируют экс-

прессию других связанных с атеросклерозом белков [78].

У тромбоцитов сигнал с CD36 через ERK5 способствует их прокоагулянтной активности, агрегации и отложению фибрина в микрососудах *in vivo* [238]. При развитии шока эритроциты, за счет индуцированной экспрессии SR-B2 (выход CD36 из внутриклеточного депо), адгезируются на эндотелиоцитах посредством взаимодействия CD36 с эндотелиальными рецепторами: интегрином — α v β 3 и VCAM-1 [40]. Этот дополнительный механизм сладж-феномена также может способствовать нарушению микроциркуляции крови и полиорганной дисфункции. Кроме того, SR-B2 (CD36), совместно с цитокинами, участвует в формировании многоядерных гигантских клеток [91]. Эти клетки выявляются при гранулематозных заболеваниях, таких как туберкулез, а также при инкапсулировании инородных тел. Хотя детальный механизм, ответственный за эти явления, остается неясным, было высказано предположение, что многоядерные макрофаги возникают в результате взаимодействия CD36 с фосфатидилсерином на поверхности соседних клеток [91].

В почках CD36 в основном экспрессируется в эпителиальных клетках канальцев, подоцитах и мезангиальных клетках (макрофагах) почечных клубочков, и уровень его заметно повышается при хронических заболеваниях почек. В экспериментальных моделях блокада антагонистов или генетический нокаут CD36 предотвращает повреждение почек, что указывает на то, что CD36 может стать мишенью для терапии этих заболеваний [238].

Таким образом, SR-B2 в кооперации с другими рецепторами может вызывать сильную провоспалительную реакцию клеток, активацию тромбоцитов и системы гемостаза в целом. В частности, при формировании пенстых клеток SR-A1 в большей степени способствуют поглощению атерогенных липопротеинов, а SR-B2 — формированию провоспалительного фенотипа этих макрофагов [184, 205, 245].

2.3. Класс D представлен единственным рецептором SR-D1 (CD68), который является характерным маркером моноцитов и стромальных макрофагов. Он содержит терминальный муциновый домен, гомологичный доменам лейкоциалина (CD43) лейкоцитов и антигену стволовых клеток (CD34), а также содержит проксимальный домен мембранных белков лизосом — LAMP (lysosome-associated membrane protein). Считается, что быстрая рециркуляция CD68 из эндосом и лизосом на плазматическую мембрану позволяет макрофагам переползать по несущим селектины субстратам или другим клеткам [32, 97].

Также CD68 участвует в поглощении макрофагами апоптотных и поврежденных клеток посредством взаимодействия с фосфатидилсерином [32, 127, 174].

Таким образом, CD68 играет роль в фагоцитарной активности тканевых макрофагов: как во внутриклеточном лизосомальном метаболизме, так и во внеклеточных взаимодействиях «клетка — клетка» и менее существенно — при взаимодействии «клетка — микроорганизм». Он связывается с лектинами и селектинами, что позволяет макрофагу «заякориваться» в определенном участке ткани и передвигаться по поверхности других клеток или мигрировать посредством взаимодействия со структурами экстраклеточного матрикса. При этом CD68 заметно не участвует в фагоцитозе патогенов, но он очень важен в остеокластах, так как его удаление приводит к снижению резорбционной способности кости [32, 127]. В то же время CD68 служит «входными воротами» для *Plasmodium falciparum* (возбудитель малярии) при инфицировании печени [32, 127]. Поглощение oxLDL усиливает в макрофагах экспрессию CD68, наряду и с другими SR [240]. Однако патогенетическая роль CD68 при атеросклерозе пока не доказана [240].

2.4. Класс E (1-4) объединяет наличие близких по происхождению лектиноподобных доменов С-типа, взаимодействующих с некоторыми микробными гликанами, с поврежденным гликокаликсом клеток и тромбоцитов, аномально гликированными белками, БТШ и некоторыми другими лигандами (табл. 1).

SR-E1 (LOX-1) является ключевым рецептором для oxLDL на эндотелиоцитах и сосудистых миоцитах. Высокая концентрация oxLDL, а также ROS и некоторых цитокинов (TNF α , TGF- β) провоцирует повышенную экспрессию LOX-1 на этих клетках [38]. В свою очередь, задействование LOX-1 запускает генерацию ROS за счет активации NADPH-зависимых оксидаз с последующей стимуляцией редокс-зависимых белков, таких как MAPK (p38, ERK1/2, JNK) и NF- κ B, а также способствует биосинтезу многих белков, участвующих в атерогенезе [145]. Кроме того, взаимодействие LOX-1 с oxLDL может запустить в клетках процесс апоптоза и повреждение эндотелиальной выстилки [38, 145]. В свою очередь, секреция эндотелием ROS способствует образованию в крови oxLDL, что в совокупности приводит к формированию порочного патогенетического круга и прогрессированию атеросклероза. Таким образом, если образованию пенистых клеток в атеросклеротических бляшках способствуют SR-A1 и SR-B2 (см. выше), то SR-E1 способствует нарушению барьерной функции эндотелия и проникновению oxLDL и моноцитов (пред-

шественников пенистых клеток) в интиму магистральных артерий. Зависимая от SR-E1 активация эндотелиоцитов и миоцитов сократительных сосудов может включаться в патогенез гипертонической болезни и многих других сосудистых заболеваний [28, 78, 176, 245].

Также было обнаружено, что мыши с отсутствием экспрессии LOX-1 имели лучшую выживаемость в модели сепсиса (лигирование и пункция слепой кишки). У этих мышей были снижены показатели системного воспалительного ответа (например, TNF α) в сыворотке крови и степень повреждения внутренних органов [8]. По крайней мере отчасти, патологическая роль SR-E1 при сепсисе связана с высоким уровнем в крови oxLDL [8].

SR-E2 (дектин-1) экспрессируется преимущественно на миелоидных клетках: моноцитах-макрофагах, ДК и нейтрофилах (табл. 1). Его экспрессия может регулироваться цитокинами и микробными стимулами. Этот рецептор распознает различные бактериальные, грибковые и растительные углеводы (β -1,3 и/или β 1-6 глюканы), в кооперации с TLR2 опосредует продукцию провоспалительных цитокинов в ответ на микробные β -глюканы [77, 217]. В этих случаях SR-E2 может функционировать в качестве фагоцитарного рецептора, действуя как через Syk-тирозинкиназные, так и Syk-независимые сигнальные пути для инициации процесса фагоцитоза. Также SR-E2 выступает в роли ко-стимулирующей молекулы для активации CD4 и CD8 Т-клеток [77, 217]. Более того, дектин-1 экспрессируется на макрофагах и ДК в мозговых областях тимуса, что указывает на его роль в развитии тимоцитов [185].

SR-E3 (CD206, маннозный рецептор 1) экспрессируется на ДК и стромальных макрофагах различных органов, включая сердце, кожу, плаценту, кишечник, жировую ткань, является маркером альтернативно активированных макрофагов — макрофагов 2-го типа (M2) [70, 190]. Кроме того, SR-E3 является маркером дифференцировки незрелых ДК, образованных из моноцитов, а также активированных антигенами ДК [70, 174].

Рецептор CD206 участвует в распознавании сложных углеводных структур на гликопротеинах, включая различные коллагены экстраклеточного матрикса (табл. 1). Он является важной частью нескольких биологических процессов, включая распознавание измененных клеток, гликопротеинов и нейтрализацию патогенов [142]. Так, было показано, что этот рецептор связывает высокоманнозные структуры на поверхности потенциально патогенных вирусов, бактерий и грибов, так что они могут быть нейтрализованы фагоцитарным поглощением. При сепсисе и других

критических состояниях в крови может накапливаться растворимая форма CD206 – sCD206 [188].

Рецептор CD206 способствует синтезу противовоспалительных (включая IL-10), но не провоспалительных цитокинов, и высоко экспрессируется (но менее активно, чем CD163, см. ниже) на связанных с гемоглобином (Hb) макрофагах – M-(Hb), которые играют протективную роль при атеросклерозе [84]. Эти макрофаги характеризуются низким уровнем оксидантного стресса и провоспалительной активности, а также наличием механизмов обратного транспорта атерогенных липидов из клетки [54].

SR-E4 (AMR) экспрессируется на клетках печени, включая клетки Купфера (табл. 1). Его основными лигандами являются обедненные сиаловыми кислотами участки гликокаликса на aberrantных клетках, особенно тромбоцитах [33, 94]. Поэтому он является ключевым рецептором при утилизации стареющих тромбоцитов, микротромбов и тромбоцитарных агрегатов. Интересно, что каскад сигнализации SR-E4 имеет сходство с сигналом IL-6, поскольку он включает фосфорилирование тирозина у киназы JAK2, обеспечивающей транслокацию транскрипционного фактора STAT3 в ядро клетки. Таким образом, как десенсилизированные тромбоциты, так и IL-6 приводят к экспрессии мРНК тромбопоэтина, опосредованной STAT3, после сигнальных каскадов AMR-JAK2 и IL-6R-JAK1 соответственно. При этом десенсилизированные тромбоциты и SR-E4 (AMR) инициируют секрецию гепатоцитами тромбопоэтина, который стимулирует тромбоцитопоэз в костном мозге [33, 94].

2.5. Класс F у человека формируется тремя рецепторами, включающими различные сочетания двух типов EGF-подобных доменов (рис. 1). Кроме того, они имеют протяженный цитоплазматический фрагмент, взаимодействующий с сигнальными ферментами и актиновыми структурами цитоскелета [101, 174].

Рецепторы SR-F1 и SR-F2 выражены экспрессируются на эндотелиоцитах и стромальных макрофагах, а SR-F1 еще и на антигенпрезентирующих ДК (табл. 1). Они распознают поврежденные клетки, продукты апоптоза и широкий спектр PAMP.

Нокаут гена SR-F1 у мышей характеризуется тяжелым аутоиммунным фенотипом, напоминающим системную красную волчанку у человека [167]. Этот фенотип аутоиммунной болезни является следствием значительного ухудшения клиренса апоптотических клеток в органах иммунной системы. Таким образом, эта функция SR-F1 не может быть полностью компенсирована другими видами SR. Когда апоптотические клетки своевременно не очищаются, процесс прогресси-

рует до феномена «позднего апоптоза». Он характеризуется частичным разрушением клеточной мембраны образовавшихся вакуолей, что не характерно для течения классического апоптоза. Этот аутолиз был назван «вторичным некрозом» [232]. Он может быть связан с недостаточной активностью стромальных макрофагов в тканях на фоне большого числа апоптоза клеток [65, 136] или дефицитом функции SR-F1 [167]. Вторичный некроз приводит к образованию DAMP и вовлекается в патогенез многих заболеваний, включая системную красную волчанку и болезнь Альцгеймера [191].

Кроме того, SR-F1 при связывании PAMP может образовывать комплексы с наружными видами TLR, ограничивая провоспалительные эффекты этих TLR [167].

Рецептор SR-F3 преимущественно локализуется в клетках макро и микроглии, а также миосателлитных клетках и может участвовать в захвате апоптотических нейронов и β -амилоидов при развитии различных нейродегенеративных заболеваний, регенерации мышечной ткани [101, 174].

2.6. Класс G у человека представлен одним рецептором – SR-G1. Этот рецептор имеет два надмембранных домена (рис. 1), а именно: дистальный или хемокиновый домен – CXCL16, который может связываться с рецептором хемокинов – CXCR6, а кроме того, муциноподобный домен [28, 224]. Рецептор преимущественно экспрессируется на стромальных макрофагах и сосудистых миоцитах, связывает, кроме CXCR6, фосфатидилсерин, oxLDL, некоторые PAMP и, кроме фагоцитоза продуктов апоптоза и клеточного некроза, может участвовать в обеспечении контакта клеток друг с другом и структурами экстраклеточного матрикса [28, 48, 127].

При атеросклерозе повышенная экспрессия SR-G1 обнаруживается в макрофагах и миоцитах зоны поражения. В этих случаях сильным индуктором SR-G1 является TNF α и IFN γ , а источником IFN γ могут являться мигрирующие в очаг Т-клетки и нормальные киллеры (NK) [224]. Кроме того, экспрессия SR-G1 стимулируется по принципу обратной положительной связи поглощением oxLDL [224]. В свою очередь, SR-G1 способствует поглощению oxLDL и миграции в очаг Т-клеток, NK и ДК через действие растворимой формы SR-G1 (хемокина – CXCL16) на рецепторы CXCR6 этих клеток [48].

2.7. Класс H у человека представлен двумя рецепторами – SR-H1 (рис. 1) и SR-H2. Эти рецепторы имеют сложный состав надмембранных доменов различного происхождения (рис. 1), включая оба варианта доменов гомологичных EGF (как и у SR-F), домен фасцилин 1 (FAS1), глобулиновый (G) домен ламинина (Laminin-

type) и шарнирный лектиноподобный домен С-типа (домен типа Link), связывающий гиалуроновую кислоту. Интегральный FAS1 представляет собой древний домен клеточной адгезии, общий для растений и животных [98]. Его внеклеточная структура состоит из двух доменов фибронектина типа III и пяти Ig-подобных доменов C2-типа, гомологичных доменам рецептора молекулярной адгезии нервных клеток (NCAM) позвоночных [119]. G-домен ламинина отвечает за связывание гепарина и за контакт клеток с экстраклеточным матриксом [213].

Оба представителя SR-H имеют похожий репертуар лигандов, включая фосфатидилсерин, гепарин, гиалуроновую кислоту и некоторые кислые гетерополисахара экстраклеточного матрикса, бактериальные PAMP, модифицированные LDL (табл. 1). Всего эти рецепторы связывают не менее 14 лигандов, а гепарин только с массой от 40 до 400 кДа может эффективно активировать SR-H2 [165].

Экспрессия SR-H1 в основном выявляется на макрофагах РЭС и M2, а SR-H2 — дополнительно и на эндотелиоцитах. Общими свойствами этих рецепторов является участие в поглощении продуктов апоптоза, oxLDL, продуктов коагуляции крови, обеспечение контакта клеток с экстраклеточным матриксом и, вероятно, кофакторное связывание отдельных бактерий и продуктов их деградации [7, 68, 122, 166]. При этом гепарин плазмы крови связывается с несколькими факторами роста, включая FGF-2, PDGF и HGF и их рецепторами [247], всего 22% белков плазмы связываются с гепарином [193]. Через гепарин SR-H могут потенциально контактировать со многими белками, которые не являются их прямыми лигандами. Через связывания фосфатидилсерина SR-H участвуют в утилизации апоптотических клеток. При этом SR-H2 может образовывать на мембране макрофага комплекс с интегриновым рецептором — $\alpha\text{v}\beta 5$, также связывающим фосфатидилсерин на поврежденных клетках [168].

Контакт SR-H, в частности SR-H2, с лигандом запускает сигнальный путь MFPK-ERK1/2 и активацию NF- κ B, но это, как правило, не приводит к выраженному клеточному стрессу и даже способствует продукции противовоспалительного цитокина — TGF- β [165, 166]. Поэтому эти рецепторы могут активно функционировать в физиологических условиях. Так, макрофагальные и эндотелиальные SR-H участвуют в ангиогенезе в норме и при воспалении, в заживлении ран, но также и в онкогенезе (васкуляризации опухолевой ткани) [126, 166, 216]. Подавление у мышей экспрессии SR-H1 на макрофагах приводит к увеличению продукции TNF α , а также

опосредованному цитокинами усилению продукции IgG и IgM [46]. Кроме того, дефицит SR-H1 на печеночных макрофагах в эксперименте (мыши) и у человека при повреждении печени замедляет процесс регенерации и способствует фиброзу, а также снижает поглощение в печени модифицированных LDL [181].

Таким образом, SR-H, прежде всего, отвечают за распознавание эндогенных лигандов, очистку крови от aberrантных клеток и метаболитов и обеспечение контакта клеток с экстраклеточным матриксом. Это приводит к развитию умеренного клеточного стресса, но и ограничению провоспалительной активности макрофагов и, возможно, эндотелиоцитов, в совокупности обеспечивающих процессы регенерации (включая ангиогенез) в норме и при разрешении воспаления, но одновременно SR-H могут способствовать опухолевому росту.

2.8. Класс I представлен тремя отдельными рецепторами (табл. 1), из которых относительно хорошо изучен SR-I1. Надмембранная часть SR-I формируется последовательно расположенными доменами SRCR-типа: девятью у SR-I1, двенадцатью у SR-I2 и восьмью у SR-I3 [177, 248].

SR-I1 (CD163) высоко экспрессируется на M-(Hb) [84], макрофагах РЭС и многих типах стромальных макрофагов внутренних органов, включая тимус, костный мозг (преимущественно эритробластические островки), головной мозг (микроглия), жировую ткань, кишечник, плаценту, а также на M2-макрофагах [51, 84, 96, 190].

Макрофаги M-(Hb) образуются из нагруженных гемоглобином (Hb) клеток. SR-I1 ответственный у M-(Hb) за поглощение внеклеточного гемоглобина, что особенно важно при гемолизе. Гемоглобин в комплексе с острофазным белком гаптоглобином является основным лигандом и стимулятором экспрессии SR-I1 (CD163). Низкоаффинно рецептор может связывать и свободный Hb. Как уже отмечалось выше, M-(Hb) обладают противовоспалительными и выраженными антиатерогенными свойствами.

Наиболее эффективными стимуляторами экспрессии CD163 являются глюкокортикоиды, IL-6, IL-10, гем/Hb, тогда как IL-4, GM-CSF, IFN γ , TNF α , CXCL4 и LPS снижают экспрессию CD163 [30]. Также рецептор может связывать фибронектин и некоторые PAMP (прямо и через фибронектин). Он участвует в фагоцитозе грамотрицательных и грамположительных бактерий, включая *E. coli* и *Staphylococcus aureus* [53, 114, 195, 220]. Экспрессия CD163 на моноцитах способствует индуцированной бактериями продукции провоспалительных цитокинов [52].

Растворимая форма CD163 (sCD163) обладает опсонизирующей активностью и повышает

ся в плазме крови при широком спектре острых и хронических воспалительных заболеваний, особенно выражено при сепсисе, малярии и гепатитах [51, 114]. Так, уровень sCD163 может иметь не меньшее диагностическое и прогностическое значение при сепсисе, чем прокальцитонин и CRP (по данным ROC-анализа) [55]. Повышенное присутствие в плазме крови sCD163 обусловлено активацией металлопротеиназы ADAM17/TACE, способной высвобождать надмембранные домены SR-I1 [50].

Мембранный и sCD163 участвуют, соответственно, в связывании и инактивации растворимой и мембранной формы провоспалительного цитокина TWEAK (связанный с TNF слабый индуктор апоптоза) [51].

Таким образом, SR-I1 является рецептором стромальных и M2-макрофагов. Он вовлекается в иммунные и гомеостатические процессы, прежде всего, отвечает за поглощение Hb, ситуационно проявляя как противовоспалительную, так и умеренную провоспалительную активность. В частности, M2-макрофаги, экспрессирующие SR-I1 (CD163) и SR-E3 (CD206), могут активно секретировать ключевые противовоспалительные цитокины — IL-10 и рецепторный антагонист IL-1 [190]. В целом увеличение экспрессии SR-I1 на макрофагах способствует ограничению продукции провоспалительных цитокинов и их дифференцировки в направлении M2 [108].

2.9. Класс J представлен единственным рецептором — SR-J1 (RAGE), который имеет растворимую форму — SR-J1.1 (sRAGE). RAGE (receptor for advanced glycation end products) — это рецептор для аномальных конечных продуктов гликирования — AGE (advanced glycation end products). Его растворимая форма образуется в результате альтернативного сплайсинга мРНК гена SR-J1, но также при протеолизе мембранной формы [203]. SR-J1 является членом суперсемейства иммуноглобулинов [174]. Его надмембранный фрагмент включает N-концевой домен V-типа, объединенный с доменом C1-типа в единую структуру — дистальный VC1-домен, который связан с проксимальным доменом C2-типа (рис. 1) [162]. Рецептор существенно экспрессируется на многих типах стромальных макрофагов, фибробластах, эндотелиоцитах, перицитах, сосудистых и некоторых других гладкомышечных клетках, эндотелиоцитах, эпителиоцитах покровных тканей, некоторых паренхиматозных клетках, включая нейроны, гепатоциты и кардиомиоциты, выявляется и на Т-хелперов 1-го типа (Th1) [128, 162, 186, 203].

Рецептор SR-J1 представляет собой метаболическую память, лежащую в основе патогенеза хронических диабетических осложнений. Задей-

ствованные RAGE выражено индуцируют активацию сигнальных путей киназы Jak-2 и активацию транскрипционных факторов клеточного стресса NF-κB и AP-1 [128, 162, 186]. Это может сопровождаться высоким уровнем клеточного стресса (в сравнении с большинством других SR) и привести к связанному с оксидантным стрессом внутриклеточному повреждению и стрессу эндоплазматического ретикулама, которые являются ключевыми процессами в атерогенезе, нейродегенерации и других проявлениях хронического воспаления низкой интенсивности [162, 223]. Кроме AGE, основными лигандами рецептора являются: окисленные белки, включая oxLDL, фосфатидилсерин, β-амилоиды, которые накапливаются в тканях при нейродегенеративных и некоторых других деструктивных хронических заболеваниях, а также внеклеточная ДНК и классические DAMP (которые выражено активируют TLR) — кальций-связывающие белки S-100 и HMGB1 (high-mobility group protein B1), а также интегриновый рецептор к комплементу (Mac-1, CR3) на лейкоцитах и макрофагах [127, 128, 203]. При этом HMGB1 накапливается в межклеточном пространстве не только как продукт тканевого распада, но может секретироваться активированными моноцитами в качестве цитокиноподобного фактора и позднего медиатора воспаления, взаимодействуя, кроме RAGE, с TLR2 и TLR4 [125]. Наиболее сильную провоспалительную реакцию при действии на SR-J1 вызывают S-100, HMGB1 и некоторые AGE, такие как карбоксиметиллизин [203]. Задействование SR-J1 на эндотелиальных клетках и лейкоцитах крови является неблагоприятным фактором при развитии септического шока, некоторых других критических состояний, сахарном диабете и системных аутоиммунных заболеваний [128, 186].

Растворимая форма SR-J1.1 может проявлять противовоспалительные свойства посредством блокирования взаимодействия лигандов с их рецепторами [203]. Это особенно важно при дисфункциональности клеточного и тканевого стресса, неспособного купировать накопление в межклеточной среде aberrантных метаболитов и продуктов тканевой деградации. Однако SR-J1.1 может индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов у лейкоцитов при действии на Mac-1 [175].

Увеличение экспрессии RAGE во время старения, возможно, связано с накоплением лигандов RAGE, которые, в свою очередь, регулируют экспрессию рецепторов в петле положительной обратной связи [162]. При этом sRAGE в плазме крови может снижаться. Предполагается, что высокий уровень sRAGE в крови положительно влияет на продолжительность жизни человека [162].

Таким образом, SR-J1 имеет важное гомеостатическое значение. Кроме того, он способствует поддержанию целостности покровных тканей, противоопухолевой резистентности [203] и реализации некоторых иммунных процессов. Однако SR-J1 может стать звеном различных дисфункциональных систем при неэффективности тканевого стресса при сепсисе, различных аутоиммунных заболеваниях, нейродегенеративных процессах, сахарном диабете 2-го типа, атеросклерозе и других патологиях, связанных с патологической активацией клеток сосудов, стромальных макрофагов и паренхиматозных клеток внутренних органов, включая нейроны и кардиомиоциты [127, 128, 203]. Учитывая способность SR-J1 связывать не только PAMP, но и ключевые для развития клеточного стресса DAMP (S-100, HMGB1) и относительно выраженно активировать клетки при действии этих лигандов (менее, чем TLR, но более других SR), некоторые авторы рассматривают RAGE как классический PRR [209].

2.10. Класс К представлен единственным рецептором — SR-K1 (CD44), имеющим лектиноподобный домен С-типа, который связывает гиалуроновую кислоту. Домен близок по функции, но не по строению с доменом Link у SR-H. Он содержит и углеводный компонент, позволяющий ему взаимодействовать с некоторыми лектинами, включая селектины. Рецептор имеет большое число изоформ (альтернативная вставка различных экзонов в мРНК, кодирующей его надмембранный фрагмент) и широко представлен на лимфоцитах, макрофагах, хондроцитах, эпителиоцитах, раковых и эмбриональных клетках, эндотелиоцитах, клетках ЦНС, гемопоэтических стволовых клетках, эритроцитах и других гемопоэтических клетках, кроме тромбоцитов [115, 192, 198]. Лигандами SR-K1 являются участки многих белков и гиалуроната экстраклеточного матрикса (табл. 1), что позволяет SR-K1 участвовать в процессах клеточной пролиферации, миграции и адгезии, включая процессы метастазирования раковых клеток [198]. В нормальных тканях функция рецептора CD44 жизненно важна для регуляции обмена гиалуроновой кислоты, клеточного хоминга, активации лимфоцитов и высвобождения цитокинов в лимфоидных органах, а также при ангиогенезе [198].

2.11. Класс L включает два рецептора — SR-L1 (LRP1, CD91) и SR-L2 (LRP2), имеющих три характерных структурных компонента (рис. 1):

1. EGF-repeat — домены с характерными EGF-подобными повторами. Эти повторы являются обычным эволюционно консервативным мотивом. Они обнаруживаются во многих секретируемых белках и внеклеточных

доменах (обычно связанных с О-гликанами) трансмембранных рецепторов [210].

2. Ligand-binding repeat — домены с лиганд-связывающими повторами, которые состоят из значительного числа tandemных повторов с небольшими структурными мотивами. Повторяющиеся тендемы представляют собой удлиненные структуры и имеют большую площадь поверхности к объему, чем типичные глобулярные белки. Они особенно хорошо подходят для обеспечения межбелковых взаимодействий и организации белков в функциональные комплексы. Кроме того, модульная структура позволяет использовать разные наборы повторов для связывания с разными видами лигандов [80].

3. β -propeller — домен с винтообразной бета-складчатостью. Белки с β -пропеллерной складчатостью имеют повсеместную природу и широко используются в качестве структурных каркасов для связывания лигандов в белках-рецепторах, ферментах, некоторых транспортных белках, их лигандами являются белковые молекулы [30].

Исходя из обозначенных выше структурных особенностей, основными лигандами SR-L1 являются высокомолекулярные белки и белковые комплексы.

SR-L1 (LRP1, CD91) выраженно экспрессируется на клетках Купфера, но также на многих других стромальных и паренхиматозных клетках и имеет очень широкий репертуар лигандов (табл. 1). В частности, SR-L1 играет ключевую роль в очистке плазмы крови и межклеточных пространств соединительной ткани от комплексов протеаза/антипротеаза, некоторых активированных протеаз, включая факторы свертывания крови, oxLDL и некоторых других aberrантных метаболитов. Посредством связывания с апопротеином Е рецептор CD91 участвует в поглощении (преимущественно в печени) остатков хиломикронов и липопротеинов очень низкой плотности после распада у них нейтрального жира под действием липопротеинлипазы. Ряд лигандов SR-L1, включая LPS, БТШ, кальретикулин, стимулируют клеточную экспрессию SR-L1, в то время как другие, включая α 2-макроглобулин и тканевой активатор плазминогена, не вызвали подобного эффекта [22]. Рецептор может связываться с микробными тельцами после их взаимодействия с C1q и фибронектином или через распознавания некоторых PAMP, а также связывать амилоидные белки и взаимодействовать с интегриновыми рецепторами на сопредельных клетках [59, 129].

Печеночный SR-L1 является существенным механизмом удаления из кровотока различного метаболического мусора [129]. Кроме того, SR-L1 является физиологическим модулятором

(преимущественно отрицательным) сигнального пути фактора роста тромбоцитов (PDGF), поэтому делеция гена SR-L1 в сосудистых миоцитах способствует пролиферации этих гладкомышечных клеток, образованию аневризмы и повышенной восприимчивости к атеросклерозу [20]. Рецептор SR-L1 облегчает представление антигенных пептидов, связанных с БТШ, опосредуя их эндоцитоз ДК [129].

В целом мембранная (CD91), но не растворимая (sCD91) форма рецептора SR-L1 обладает противовоспалительными эффектами [22, 129]. В частности, у мышей после удаления мембранной формы SR-L1 в миелоидных клетках ответ на LPS был значительно более выражен [139]. Аналогичным образом антагонисты рецептора (специфичные к нему антитела и лактоферрин) стимулируют продукцию медиаторов воспаления [139]. Напротив, агонисты рецептора — α 2-макроглобулин и тканевой активатор плазминогена (tPA) — ослабляют продукцию провоспалительных цитокинов даже в присутствии LPS.

Рецептор SR-L1 на шванновских клетках может взаимодействовать с продуктами деградации миелина, активировать путь ERK1/2, тем самым способствуя регенерации миелиновых нервных волокон на раннем этапе их повреждения [59].

Таким образом, SR-L1 отвечает за очистку кровотока от метаболического мусора, последствий внутрисосудистого свертывания крови и внутрисосудистого протеолиза, регулируя при этом процессы тканевого провоспалительного стресса (растворимая и мембранная форма — разнонаправленно) и тканевой регенерации. Особая роль SR-L1 заключается в очистке плазмы крови и других тканей от комплексов протеаза/антипротеаза, в этих случаях в качестве антипротеаз могут выступать следующие факторы: α 2-макроглобулин, α 1-ингибитор протеиназ (α 1-антитрипсин), антитромбин III, гепарин-кофактор II, ингибитор C1q, ингибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1), ингибитор протеазы протеина C, ингибитор индукции тканевого фактора (TFPI), нексин-1, нейросерпин, апротинин, а также белково-протеазные комплексы зоны беременности. Кроме того, SR-L1 может связывать комплекс — тромбоспондин-1/матриксная металлопротеиназа-2 (MMP-2) и свободные MMP-9, MMP-13 и tPA [129].

Рецептор SR-L2 широко представлен на эмбриональных клетках, на эпителиоцитах и нейронах. Он обеспечивает поглощение клетками нативных LDL, контакт клеток с экстраклеточным матриксом, морфогенетическим белком — Shh, участвует в процессах эмбриогенеза, морфогенеза, созревания и дифференцировки клеток [57].

2.12. Неклассифицированные SR включают шесть видов SR, которые пока не верифицированы в конкретных классах этого семейства.

Рецептор SRCRB4D имеет четыре надмембранных доменов SRCR-типа [164]. Он выявляется в различных тканях, но особенно выражен в эпителии и некоторых видах раковых клеток, основными лигандами рецептора являются PAMP и модифицированные LDL [140, 164]. SRCRBS4D может участвовать в гомеостатических функциях, таких как врожденная защита, рост и поляризация эпителиоцитов.

Рецептор SSC5D состоит из пяти SRCR доменов и одного муциноподобного домена [131]. Он способен связывать некоторые PAMP и преимущественно экспрессируется на макрофагах и Т-клетках. Рецептор имеет и растворимую форму, может распознавать разные виды и штаммы бактерий, включая *E. coli* и *Listeria monocytogenes* [131].

CD14 экспрессируется на различных миелоидных клетках, но в основном на моноцитах и макрофагах [4]. Он действует как ключевой корецептор TLR4 при связывании LPS в комплексе с острофазным LPS-связывающим белком. Взаимодействие TLR4 и CD14 приводит к выраженной активации сигнальных путей клеточного стресса, включая MAPK и NF- κ B, высвобождению цитокинов, включая TNF α и IL-1 β , и формированию воспалительного фенотипа клетки [4, 124]. Кроме того, подобно TLR1 и TLR2, может взаимодействовать с БТШ [12]. Растворимая форма рецептора — sCD14 — связывает триацилированные липопротеины грамположительных бактерий и активирует в таком виде одновременно TLR1 и TLR2 [180]. В последнем случае действие sCD14 на TLR не зависит от LPS-связывающего белка. Повышение в крови sCD14, обозначаемого как пресепсин, характеризует системную активацию макрофагов, прежде всего РЭС. В настоящее время динамика изменения концентрации пресепсина в крови является диагностическим и прогностическим маркером грамотрицательного и грамположительного сепсиса, но sCD14 также может существенно повышаться и при ряде неинфекционных патологий, включая пациентов с ишемической болезнью сердца, сердечной недостаточностью, циррозом печени, сахарным диабетом, почечной недостаточностью и т. д. [252]. В частности, CD14 моноцитов и sCD14 были описаны как маркеры стабильной стенокардии [124].

Ly75 (CD205) представляет собой трансмембранный белок типа I, состоящий из сигнального пептида, домена SRCR-типа, домена фибронектина типа II, десяти лектиноподобных доменов, трансмембранного домена и цитоплаз-

матического хвоста [26, 107]. Рецептор CD205 преимущественно экспрессируется на зрелых ДК и В-лимфоцитах и участвует в фагоцитозе дендритами ряда микроорганизмов, включая HIV (табл. 1).

CD207 (Langerin, лангерин) содержит внеклеточный лектиноподобный домен С-типа, специфичный для маннозы, N-ацетилглюкозамина и фукозы [204]. CD207 экспрессируется на макрофагах, а также ДК лимфоидных органов, кожи и слизистых оболочек [39, 58]. Экспрессия лангерина вызывает образование гранул Бирбека (отличительных органелл клеток Лангерганса). Он участвует в фагоцитозе многих патогенов и презентации антигена Т-лимфоцитам, а также в контактах клеток с гликанами экстраклеточного матрикса [39, 58].

CD209 (DC-SIGN) также относится к С-лектинам, преимущественно экспрессируется на стромальных макрофагах, но особенно на ДК, участвует в фагоцитозе различных патогенов (табл. 1). Рецептор DC-SIGN способен вступать в кооперативные отношения с TLR; его задействование приводит к активации киназы Raf-1 и, в зависимости от лиганда и кооперации с другими рецепторами, нескольких сигнальных путей клеточного стресса ниже Raf-1, включая и активацию транскрипционного фактора NF-κB, важного для реализации многих иммунных процессов [43, 112]. Он может связываться с рецептором ICAM-3 Т-клеток при их взаимодействии с ДК, а экспрессию CD209 на ДК могут усиливать цитокины Th2 (IL-4, IL-10, M-CSF) [190].

Глава 3. Функциональное значение SR в норме и патологии

Для SR характерна высокая степень полифункциональности как при развитии физиологических, так и патологических процессов. Особенно очевидно значение SR при формировании переходных состояний: от нормы к патологии и при трансформации патологических процессов из одного качества в другое. Это связано с задействованием SR как в обеспечении метаболического гомеостаза и клеточного оборота, так и в процессах иммунной и воспалительной реактивности при тканевом повреждении различного генеза. При всех разнообразиях этих процессов они включают в себя типовые составляющие, связанные с развитием тканевого стресса, характерного не только для канонического, но и неклассического воспаления (паравоспаления), которое развивается в ответ на повреждения низкой интенсивности без развития характерных местных признаков канонического воспаления [83]. Так, целостный комплекс характерных признаков классического воспаления появился в эволюции только у позвоночных животных, имеющих

прогрессивные системы: микроциркуляции крови, нейроэндокринных и лимфоидных органов и способных к развитию экссудативно-сосудистых реакций [2]. Между тем основные эволюционно консервативные механизмы врожденного иммунитета, отдельные проявления системного воспалительного ответа и особые (неклассические) формы нелимфоцитарного адаптивного иммунитета выявляются и у беспозвоночных [2]. Таким образом, тканевой стресс является очень широким понятием, а процессы, связанные с цитокинами, PRR, SR и другими иммунными факторами, вовлекаются у человека не только в патогенез различных соматических заболеваний, но и в развитие физиологических процессов [83].

3.1. SR в обеспечении пролиферации клеток и тканевого роста

Растущие и регенерирующие ткани, а также ткани с высоким уровнем клеточного оборота характеризуются продукцией различных ростовых и трансформирующих рост факторов, аденозина, адреномедулина, проадреномедулина, метаболических цитокинов (например, FGF-21) и других медиаторов, препятствующих развитию инсулинорезистентности (в факультативно гликолизующих тканях) и выраженной провоспалительной активности клеток [1, 62, 83, 146]. По мере прогрессирования тканевого стресса продукция этих медиаторов может возражать, но уже на фоне доминирующей роли провоспалительных цитокинов [83, 229].

Рассматриваемая стадия тканевого стресса характерна для интенсивных физиологических пролиферативных процессов, включая нормальный иммуногенез, а также для восстановительной стадии воспалительного процесса, но может негативно проявлять себя при опухолевом росте. Более выраженные проявления провоспалительного клеточного стресса, например оксидантный стресс, могут сами способствовать повреждению ДНК и остановке клеточного цикла, ограничению анаболических процессов и развитию инсулинорезистентности, активации процессов аутофагии и убиквитин-протеасомного расщепления эндогенных белков [83].

Функция SR на начальной стадии развития тканевого стресса заключается в обеспечении питания делящихся клеток (холестерином, фосфолипидами, белками — источниками незаменимых аминокислот), в ограничении флогенных механизмов клеточного стресса, а также в реализации адгезивной и миграционной активности клеток. Эти функции связаны со многими SR (глава 2), особенно: SR-B1 [5, 149, 152], SR-F1 [167], SR-F3 [101], SR-H1/2 [165, 181, 193, 247], SR-I1 [9, 51, 190], SR-I2 [148], SR-K1 [198], SR-L1 [59, 129], SR-L2 [57]. Определенный уро-

вень клеточного стресса, прежде всего комплексный ответ клетки на повреждение ДНК, является необходимым условием поддержания клеточного цикла в растущих и регенерирующих тканях [41]. В процессе клеточного цикла противоречиво активируются как антиапоптотические (направленные на выживание клеток), так и проапоптотические (направленные на удаление необратимо поврежденных или дисфункциональных клеток) сигнальные пути клеточного стресса [146]. При этом продукты апоптоза должны своевременно удаляться стромальными макрофагами с помощью многих SR, включая, SR-F1 (раздел 2.5). Нарушение этих функций лежит в основе патогенеза многих иммунозависимых заболеваний. Одновременно SR способствуют выживанию и развитию опухолевой ткани, поскольку опухолевые клетки активно экспрессируют многие виды SR [242].

Обозначенный уровень тканевого стресса также проявляет себя при развитии адаптивных физиологических процессов, связанных с кратковременным действием повреждающих факторов низкой интенсивности [83, 146]. В этих случаях, после достижения протективного эффекта функциональные системы тканевого стресса распадаются, а обменные процессы возвращаются к состоянию гомеостаза. Однако при хронизации и возрастании интенсивности повреждающего фактора и усилении провоспалительных свойств тканевого стресса формируется устойчивое состояние аллостаза (измененного гомеостаза), которое является основой для развития многих хронических соматических заболеваний [144]. При этом для формирования аллостаза имеет значение способность SR повышать уровень своей экспрессии на клетках по мере увеличения их лигандов в околоклеточной среде [28, 174]. В конечном итоге это приводит к неустойчивому равновесию между изменениями гомеостаза с одной стороны и возрастающей функциональной активностью SR с другой. При этом функции SR могут приобретать не только протективные, но и дезадаптационные свойства, впрочем, как и другие механизмы клеточного и тканевого стресса.

3.2. SR в процессах презентации антигена Т-лимфоцитам

Процессы представления антигена посредством белков главного комплекса гистосовместимости — МНС (major histocompatibility complex) 1-го и 2-го класса (МНС-I/II) — наивным Т-лимфоцитам обеспечивают их селекцию в тимусе и инициацию иммунного ответа на конкретные антигены в периферических лимфоидных органах [4]. В свою очередь, представление антигена зрелым антиген-специфичным Т-клеткам является одним из ключевых событий реализа-

ции адаптивного иммунитета в очаге воспаления [4]. В этих процессах принимает участие большое число антигеннеспецифичных факторов, включая цитокины, TLR и SR. При этом SR участвуют в настройке этого процесса, включая регулирование клеточного стресса, поглощение и предварительную обработку антигенного материала, в определении порога чувствительности к дозам антигена, выраженности и формы иммунного ответа, а также предотвращение аутоиммунной агрессии [28, 174, 245].

Основными антигенпредставляющими клетками (АПК) лимфоидных органах являются различные виды ДК. При этом SR дендроцитов способны распознавать PAMP различных бактерий, вирусов и грибов, а также вступать в кооперативные отношения с TLR и другими рецепторами, регулируя процесс поглощения и представления антигена дендроцитами наивным CD4⁺Т-лимфоцитам посредством белков МНС-II [4, 28, 245]. В этих целях ДК и другие АПК имеют широкий набор SR, в той или иной степени участвующих в фагоцитозе и пиноцитозе антигенов, включая: SR-A1 (CD204), SR-A6 (MARCO), SR-B1, SR-B2 (CD36), SR-D1 (CD68), SR-E1 (LOX-1), SR-E2 (Dectin-1), SR-E3 (CD206), SR-F1, SR-I1 (CD163), SR-L1 (CD91), CD205, CD207, CD209 (глава 1, табл. 1). При этом задействование SR-J1 (RAGE) не влияет на антигенпрезентирующую функцию ДК, но SR-J1 необходимы зрелым ДК для их миграции в фильтрующие очаг воспаления лимфатические узлы [137]. Рецепторы SR-D1 (CD68) и SR-L1 (CD91) также участвуют в миграции ДК и их адгезии на экстраклеточном матриксе [32, 97, 129].

Многие SR (табл. 1) и TLR2/4 на поверхности АПК способны связывать и поглощать индуцибельные формы БТШ (семейств HSP70 и HSP90) в комплексе с чужеродными или аутогенными белками, которые выделяются из некротических клеток, включая опухолевые антигены [12, 200]. В этих случаях ДК приобретают способность представлять поглощенные из внеклеточной среды антигены и CD8⁺Т-клеткам с помощью МНС-I. Так, доказана высокая активность SR-L1 (CD91) и HSP90 (точнее, gp96) в индукции и реализации противоопухолевого иммунитета, а именно в обеспечении взаимодействия противоопухолевых макрофагов (M1) с цитотоксическими CD8⁺Т-лимфоцитами (ЦТЛ) и CD4⁺Th1 [200, 242]. Опухолевые клетки, как правило, не экспрессируют белки МНС-I, поэтому ЦТЛ и M1 действуют на них дистанционно — через выделение цитотоксических факторов после взаимодействия друг с другом. В свою очередь, SR-F1 способствует поглощению дендроцитами комплексов онкоантиген-

HSP70 и развитию противоопухолевого иммунитета, но менее активно, чем SR-L1 и HSP90 [76]. Противоопухолевый иммунитет зависит от дозы комплексов БТШ-онкоантигены. Так, их высокие концентрации при участии TLR формируют иммунную толерантность к этим антигенам [200].

Распознавание БТШ на апоптотных клетках с помощью LOX-1 и других SR позволяет макрофагам в костном мозге фагоцитировать умирающие клетки и способствует высвобождению этими фагоцитами IL-6 и IL-1 β , а также увеличивает экспрессию на ДК лимфоидных органов важных для контакта с Т-лимфоцитами рецепторов CD80 и CD86 [248]. Одновременно SR являются механизмом ограничения функции АПК, например, SR-A1 (CD204) в отношении развития противoinфекционного и противоопухолевого иммунитета [239, 242]. По-видимому, эти функции SR делают иммунный ответ более сбалансированным и адекватным, но могут в определенных случаях принимать и дисфункциональный характер.

3.3. SR при функциональной поляризации макрофагов и Т-лимфоцитов

Макрофаг является ключевой клеткой врожденного иммунитета. В процессе развития продуктивного воспаления макрофаги подвергаются морфофункциональной дифференцировке и могут активироваться и поляризоваться в двух основных направлениях: классический тип активации и дифференцировки – в M1 и альтернативный – в M2 [4]. Эти типы макрофагов вступают в кооперативные отношения, соответственно, с Th1 (ключевые продуценты – IFN γ) или Th2 (IL-4, IL-5), а отдельные субпопуляции M2 с Th17 (IL-17), участвующих в ответе иммунной системы на инвазию внеклеточных бактерий и при развитии аутоиммунных процессов, а также с иммуносупрессорными Т-регуляторными клетками – Treg (IL-10, TGF- β) [4, 235].

Современная классификация M, образующихся из моноцитов под действием различных стимулов *in vitro*, включает 10 субпопуляций в диапазоне M1-M2 [153]. Вероятно, *in vivo* эта дифференциация может происходить еще сложнее [69]. Дифференцировка Th также отличается пластичностью. Так, под воздействием определенных спектров цитокинов возможно превращение: Treg – в Th17 или Th2, Th17 – в Th1, а Th2 – в CD4⁺Т-клетки, которые могут одновременно продуцировать цитокины конкурентных видов Th, а именно IL-4 и IFN γ [132, 160, 226]. В целом субпопуляции Th1 и Th2, как и M1 и M2, гетерогенны, они могут подразделяться на более частные субпопуляции [93]. Упрощенно воспалительные макрофаги можно подразделить на 4 подмножества, каждое из которых взаимодействует с комплементарными субпопуляциями

CD4⁺ Т-клеток: 1) Th1 $\leftrightarrow$ M1; 2) Th2 $\leftrightarrow$ M2a; 3) Th17 $\leftrightarrow$ M2b; 4) Treg $\leftrightarrow$ M2c [4, 140, 235]. Эти взаимодействия вовлекают в процесс и другие клетки (ЦТЛ, НК, мастоциты и гранулоциты крови) и, соответственно, формируют 4 вектора иммунного ответа (i1, i2, i3, i-reg), каждый из которых придает определенное направление развитию воспаления [235]. При этом различные векторы иммунной реактивности могут иметь зоны функционального перекрытия и взаимодействия, включая и конкурентные i1 и i2, например при бронхиальной астме [130].

В свою очередь, фенотипические особенности стромальных макрофагов более существенно связаны гомеостатическими факторами микроокружения этих клеток. Например, гипоксия может смещать фенотип макрофагов в направлении M2 [177], поэтому некоторые авторы предлагают перейти к нелинейным, более сложным моделям оценки этих клеток [155]. Кроме того, необходимо учитывать то, что отличие в фенотипических маркерах M1 и M2 носит, как правило, не качественный, а количественный характер, с наличием промежуточных вариантов их экспрессии [177, 235]. При одновременном сопоставлении таких признаков, как источники активации, маркерный фенотип, спектр секретируемых цитокинов и функциональная направленность клеток, эти позиции будут не всегда четко коррелироваться друг с другом. В целом, несмотря на то, что процесс дифференцировки моноцитов в макрофаги необратим, поляризация макрофагов представляется обратимой [173, 208]. Фенотип и функция макрофагов зависят от многочисленных стимулов окружающей среды, которые модулируют их активацию и поляризацию [37]. Поэтому в большинстве случаев при оценке субпопуляций M, особенно стромальных макрофагов, правильное говорить об их морфофункциональном смещении к тому или иному полюсу – M1 или M2. При этом линейная модель диапазона M1-M2 является упрощенным ее вариантом. Вероятно, более адекватной будет плоскостная [235] или даже объемная модель.

Макрофаги M2 являются иммунными клетками с высоким уровнем фенотипической гетерогенности. Они (M2a) управляют функциями на границе иммунитета, тканевого гомеостаза, метаболизма, нейроэндокринной и тканеспецифичной паракринной регуляции [190]. Макрофаги M2 идентифицируют на основе экспрессии характерных для них маркеров [4, 190, 234]. Эти маркеры представляют собой трансмембранные гликопротеины, SR, ферменты, факторы роста, гормоны, цитокины и рецепторы цитокинов. Макрофаги M2a высоко экспрессируют аргиназу-1, противовоспалительные цитокины

(включая, IL-10), а также IL-6, хемокины CCL17 и CCL22 [4, 190, 235]. В целом макрофаги M2a участвуют в процессах поствоспалительной регенерации, фиброзе, формировании гранул, хронизации воспаления, продуктивного аллергического воспаления и в иммунном ответе на мета-зойную инфекцию. Они функционально наиболее близки к стромальным макрофагам и имеют характерный маркерный фенотип, включающий и некоторые SR, прежде всего SR-E3 (CD206), SR-I1 (CD163), а также SR-A1 (CD204) и SR-H1 (табл.1) [4, 28, 190, 234]. Например, SR-A1 при инфекции подавляет транслокацию в ядро клетки транскрипционного фактора IRF5 (Interferon Regulatory Factor 5), а снижение ядерного IRF5 смещает поляризацию макрофагов с M1 в сторону M2, что впоследствии переключает ответы Th1 на Th2 [234]. В целом повышенная экспрессия SR-A1 (CD204) и SR-I1 (CD163) способствует противовоспалительным функциям M2: клиренс умирающих клеток, секвестрация провоспалительного цитокина TWEAK, клиренс комплексов гемоглобин-гаптоглобин в местах повреждения тканей и последующее производство противовоспалительных цитокинов [50, 234]. Рецептор SR-E2, участвующий в фагоцитозе патогенных бактерий и грибов, может высоко экспрессироваться как на M2a, так и M1 [190].

Макрофаги M1 высоко экспрессируют белки MHC-II (особенно HLA-DR) и контактные рецепторы для взаимодействия с Т-клетками — CD80 и CD86, а также FcγR2/3 (CD32/CD16) [4, 190]. Они способны интенсивно секретировать ключевые провоспалительные цитокины (IL-1β, IL-12 и TNFα) и хемокины — CXCL9, CXCL10, CXCL11. Макрофаги M1 необходимы для очистки от бактериальных (особенно внутриклеточных), грибковых и вирусных инфектов, но могут вызвать повреждение собственных тканей, также участвуют в отторжении аллотрансплантата, аутоиммунных процессах и в противоопухолевом иммунитете [4]. В целом фенотип M1 характеризуется более выраженной экспрессией TLR, FcγR, Mac-1 (CR3), но не SR. Однако некоторые SR могут в значительном количестве экспрессироваться не только на M2, но и на M1, в силу их многофункциональности, способности образовывать рецепторные комплексы с TLR и Fc R и взаимодействовать с Mac-1. К этим SR, прежде всего, относятся SR-B2 (CD36), SR-A6 (MARCO) и SR-J1 (RAGE) [28, 234, 245], а также SR-E2 [190]. Так, действие DAMP на SR-J1 как у CD4⁺Th, так и у M1 способствует дифференцировке и пролиферации Th1 [88, 128, 203]. Одновременно SR-J1 может активировать ключевой транскрипционный фактор Th17, а именно STAT3 [186] и в определенных случаях сти-

мулировать образование Th17 из наивных CD4⁺ Т-клеток [88]. В свою очередь, SR-B2 (CD36) на макрофагах M1 способствует формированию их характерного фенотипа путем образования мембранного кластера — CD36-TLR для последующего производства воспалительных цитокинов. Так, взаимодействие с лигандами рецепторных комплексов CD36-TLR4-TLR6 в макрофагах M1 (включая микроглию) приводит к стерильному воспалению и последующему повреждению тканей в местах накопления β-амилоида [28]. Прежде всего, провоспалительная функция CD36 у M1 связана с выраженной экспрессией на этих клетках TLR4 [138].

Таким образом, хотя SR более заметно выражены на макрофагах M2, они не являются исключительными для этой популяции и могут способствовать и провоспалительным реакциям макрофагов M1 в определенных контекстах. При смещении фенотипа макрофагов в сторону M1 может отмечаться снижение экспрессии SR-A1 и реципрокное повышение SR-A6 (MARCO), который позитивно регулирует продукцию провоспалительных цитокинов, в то время как SR-A1 вызывает противоположный эффект [105], в том случае, если SR-A1 не вступает в кооперацию с TLR4 под воздействием высоких концентраций LPS [241]. При этом не стоит переоценивать противовоспалительный потенциал поляризации макрофагов в направлении M2. Так, сверхэкспрессия CD163, CD204 и CD206 на альвеолярных макрофагах может быть одним из важных патогенетических механизмов хронической обструктивной болезни легких [106]. Следовательно, при изучении роли SR в иммунопатогенезе конкретных заболеваний необходимо учитывать общие закономерности поляризации иммунокомпетентных клеток, нечеткости этих закономерностей и особенности реализации их функций в каждом конкретном случае.

3.4. SR при злокачественных опухолевых заболеваниях

По отношению к организму опухолевая ткань является антисистемой, ядром которой выступают сами опухолевые клетки, с формировавшейся у них программой паразитизма. Эта программа формируется в результате накопления спонтанных мутаций и действия онковирусов на ядерную ДНК, а также различных нарушений эпигенетической регуляции [23]. Функциональными подсистемами опухолевой ткани являются микрососуды и связанные с опухолью макрофаги, имеющие ряд характеристик M2, а именно макрофаги TAM (tumor associated macrophages) [242]. Эти макрофаги обладают иммуносупрессорной функцией в отношении противоопухолевого иммунитета и одновременно гомеостатической функцией

для обеспечения роста опухоли. Они образуются из проникающих в опухолевую ткань моноцитов и имеют высокую экспрессию маркеров CD204 (SR-A1) и CD163 (SR-I1) [242]. В целом TAM гетерогенны и являются основными иммунными, или с учетом их иммуносупрессорной функции, псевдоиммунными клетками опухолевой ткани. В частности, высокая экспрессия на клетках TAM CD204 и CD163 в первичной опухоли, а не общее количество TAM, связана с плохим клиническим исходом при светлоклеточном раке почки [151]. Экспрессия рецептора CD204 на клетках TAM способствует развитию глиомы [78] и многих других опухолевых заболеваний [242]. В целом CD163⁺CD204⁺TAM более существенно секретируют противовоспалительные цитокины — IL-10 и запрограммированной смерти лиганд 1 — PD-L1 (programmed death ligand 1), в сравнении с CD163⁺CD204⁻ и CD163⁻CD204⁺TAM [120]. При этом PD-L1, секретируемый макрофагами в очаге воспаления, может протективно блокировать Т-клеточный иммунитет и усиливать образование Treg при аутоиммунных процессах, отторжении аллотрансплантата и плацентарных патологиях, но при опухолевом росте PD-L1 и IL-10 блокируют развитие противоопухолевого иммунитета, способствуя тем самым опухолевому росту [120].

Между тем экспрессия CD204 и CD163 на TAM снижается в метастазах при светлоклеточном раке почки [151]. Правда, не ясно, насколько связан этот феномен с действием на метастазы противоопухолевого иммунитета. Аналогичным образом при раке молочной железы клетки с признаками M1 (высокая продукция провоспалительных цитокинов), с учетом смешанного фенотипа TAM при этом заболевании, связаны с агрессивностью опухолевого роста [31]. Однако, напротив, экспрессия и активация SR-A6 (MARCO) на TAM индуцируют противоопухолевую активность при раке молочной железы и раке толстой кишки, а также в моделях меланомы путем перепрограммирования популяций TAM в клетки с провоспалительным фенотипом M1, способствующих цитолизу опухолевых клеток и повышению их иммуногенности [78]. Также была показана возможность SR-G1 (CXCL16) усиливать провоспалительный фенотип макрофагов и их противоопухолевую активность в отношении колоректального рака [109]. Однако растворимая форма SR-G1, а именно хемокин CXCL16, продуцируемый раковыми клетками, способствует их пролиферации и миграции [44]. Эти противоречия определяют необходимость учета не только общих закономерностей, но и частных особенностей взаимодействия опухо-

ли и иммунной системы при рассмотрении каждой конкретной нозологической формы и стадии опухолевого роста.

Как уже отмечалось выше, некоторые SR, особенно SR-L1 и SR-F1, на ДК участвуют в развитии и регуляции противоопухолевого иммунитета (раздел 3.2). Дополнительно связывание с лигандами SR-E2 может активировать макрофаги, ДК и другие миелоидные клетки и выступать в качестве адъювантов при формировании противоопухолевого иммунитета, а также прямо активировать цитотоксическую функцию NK [242].

Экспрессия на самих опухолевых клетках SR-A5, как правило, способствует противоопухолевому эффекту иммунной системы, а экспрессия рецепторов SR-A3, SR-B2 (CD36), SR-G1 и SR-J1 (RAGE) оказывает неоднозначный эффект [186, 203, 242]. Напротив, эндотелиальный рецептор SR-H2 (stabilin-2) участвует в васкуляризации и способствует росту опухолевой ткани [165, 214]. В свою очередь, рецептор SR-B1 на опухолевых клетках способствует их росту, во-первых, посредством поглощения этими клетками липидов и белков [222]. Второй механизм основан на способности SR-B1 инициировать внутриклеточный сигнальный каскад, который приводит к увеличению пролиферации опухолевых клеток и усилению анаболических процессов посредством активации пути PI3K/Akt [222]. Третий механизм SR-B1 связан с подавлением провоспалительной реакции эндотелиоцитов и острого воспаления, что способствует васкуляризации опухолевой ткани [222]. Экспрессия на опухолевых клетках SR-E1 (LOX-1) также способствует полезному для их выживания питанию и уровню клеточного стресса [111]. Кроме того, экспрессия SR-H1 и SR-H2 на макрофагах и эндотелиоцитах (SR-H2) опухолевой ткани, как правило, способствует опухолевому росту, а их блокада вызывает противоположный эффект [242]. Также способствует пролиферации и миграции опухолевых клеток SR-K1 (CD44) [198]. При этом повышенные уровни растворимого CD44 в сыворотке пациентов являются маркером опухолевого роста при нескольких раковых заболеваниях, включая рак толстой кишки и желудка [198].

Таким образом, значение SR при опухолевых заболеваниях весьма разнообразно и зависит от вида SR, типа и стадии развития самой опухоли, характера противоопухолевой реактивности макроорганизма. В целом это позволяет рассматривать препараты, действующие на SR, как перспективный класс лекарственных средств для противоопухолевой терапии, а некоторые растворимые формы SR — в качестве диагностических маркеров опухолевого роста [222, 242].

3.5. SR при развитии метаболического синдрома и диабета 2-го типа

Патогенез метаболического синдрома связан с развитием хронического воспаления низкой интенсивности (системного паравоспаления), преимущественно развивающегося в факультативно гликолизирующих тканях, прежде всего в печени и жировом депо. Этот процесс характеризуется умеренными проявлениями системной воспалительной реакции, включая острофазный ответ печени, а также инсулинорезистентностью, гапатозом, эндотелиозом, саркопенией, ожирением [38, 62, 171]. При прогрессировании инсулинорезистентности метаболический синдром трансформируется в сахарный диабет 2-го типа. В свою очередь, типичными спутниками этих патологий являются гипертония, выраженный атеросклероз, клинически значимые или латентные проявления нейродегенерации, хронические патологии печени [62, 83, 147, 171]. Ведущую патогенетическую роль здесь играют стромальные макрофаги, но также паренхиматозные, а в некоторых случаях и лимфоидные клетки. Основными типовыми причинами этих патологий являются старение клеток, снижение их пролиферативного потенциала, накопление в постмитотических клетках повреждений генома и протеома, развитие митохондриального, оксидантного стресса [62, 83], что приводит к атрофии паренхимы внутренних органов, их фиброзу и астроглиозу (в ЦНС). В качестве повреждающих факторов низкой интенсивности могут выступать продукты измененного метаболизма, прежде всего избыток высших жирных кислот (ВЖК) и их производных, способных повреждать митохондрии (феномен липотоксичности) и провоцировать развитие оксидантного стресса [196, 218, 244]. Кроме того, высокие концентрации ВЖК могут прямо активировать SR-B2 (табл. 1) и TLR2 [199], а патологической активации клеток могут способствовать и более типичные для SR лиганды, например AGE и oxLDL.

Наиболее высокая экспрессия и репертуар SR выявляются на клетках печени, а их дисфункция способствует инсулинорезистентности, гепатозу и фиброзу печени, а при дальнейшем прогрессировании процесса — неалкогольной жировой болезни печени, неинфекционному гепатиту, циррозу, развитию гепатоцеллюлярной карциномы [10, 178]. При этом растворимые и мембранные формы многих SR могут использоваться как биомаркеры прогрессирующих заболеваний печени, включая цирроз и рак [10]. Особую патогенетическую роль в SR-зависимых процессах играют клетки Купфера, M1-M2 поляризация которых в этом случае носит нечеткий, эклектичный характер [178].

Развитие инсулинорезистентности жировой ткани связано с регуляторными эффектами ВЖК [179], с изменениями продукции адипокинов [85] и действием на адипоциты медиаторов воспаления со стороны стромальных макрофагов жировой ткани [62, 147, 171]. В норме эти макрофаги экспрессируют ряд типичных для M2-маркеров, включая SR-E3 (CD206) [70, 190].

Ожирение характеризуется активацией и увеличением числа макрофагов в жировой ткани, а при прогрессировании процесса и миграцией в жировую ткань определенного количества Т-лимфоцитов, включая рециркулирующие Th1 и Th17 иммунной памяти, а также поляризацией макрофагов в направлении M1 [216, 236]. При этом провоспалительные процессы в жировой ткани дополнительно потенцируются высокими концентрациями в крови атерогенных липопротеинов [108]. Действие этих и других лигандов SR на макрофаги жировой ткани через SR-B2 (CD36) и SR-E1 (LOX-1), а также прямо на адипоциты, через CD36, способствует активации этих клеток и развитию инсулинорезистентности [27, 54, 182]. В то время как данные о влиянии на эти процессы SR-A противоречивы [182, 249]. При этом LOX-1 дополнительно участвует в активации эндотелиоцитов и миоцитов сосудов, а его растворимая форма повышается в крови у больных с ожирением и метаболическим синдромом и может использоваться для мониторинга их лечения [158]. При трансформации процесса до диабета 2-го типа и выраженной гипергликемии в тканях накапливаются лиганды SR-J1 (RAGE) — AGE, что также приводит к патологической активации клеток сосудов, а также гепатоцитов и кардиомиоцитов [162, 203, 223].

3.6. SR при атеросклерозе

Атеросклероз можно рассматривать как самостоятельный вид общепатологического процесса, который занимает промежуточное положение между паравоспалением и каноническим воспалением продуктивного типа [83]. С продуктивным типом воспаления атеросклероз сближает наличие макрофагальной инфильтрации, образованной из мигрирующих в интиму артерий моноцитов, но преимущественно через эндотелиальную выстилку артерий, а не из системы микроциркуляции крови. На различных стадиях атеросклероза в процесс могут вовлекаться CD8⁺ и CD4⁺T-клетки, а также NK [121], а их миграции может способствовать выделяемая макрофагами растворимая форма SR-G1 (хемокин CXCL16) [48]. Однако очевидно то, что при атеросклерозе активация макрофагов прямо связана с изменениями метаболического гомеостаза и факторами тканевого старения сосудистой стенки [16, 78, 205]. Вероятно, лимфоидные клет-

ки оказывают дополнительное влияние на процессы активации макрофагов, но его характер нуждается в уточнении.

Таким образом, процесс атеросклероза пожилого возраста, прежде всего, связан с накоплением атерогенных липопротеинов в крови, нарушением барьерной функции эндотелия артерий, миграцией в интиму сосудов моноцитов и атерогенных липопротеинов, их поглощением моноцитами с помощью SR, с последующим превращением моноцитов в насыщенные холестерином пенистые клетки и другие виды макрофагов с признаками M1 или M2, развитием фибриновых изменений, а в менее благоприятных вариантах течения заболевания — его переходом в стадии атероматоза и кальциноза с окклюзией просвета артерий и риском развития тромбеморрагических осложнений [16, 37, 208]. В эти процессы так или иначе вовлекаются большинство SR, но прежде всего SR-E1 — активация эндотелиоцитов и нарушение барьерной функции эндотелия, SR-A1 — наиболее значительная роль при поглощении макрофагами oxLDL и SR-B2 — липопротеинзависимая активация макрофагов [78, 205]. Также может участвовать в негативной активации эндотелиоцитов и макрофагов рецептор SR-J1 (RAGE) [128, 186], распознающий AGE, некоторые DAMP и модифицированные ROS эндогенные белки (табл. 1). Противоположным образом на развитие атеросклероза действуют SR-A1, SR-L1 и многие другие SR печеночных клеток, которые поглощают модифицированные LDL и тем самым препятствуют их накоплению в кровотоке. В частности, уменьшение печеночного SR-L1 приводит к увеличению уровней в плазме крови метаболического мусора и ускоряет развитие атеросклероза [129].

При этом характер течения атеросклероза существенно зависит от морфофункциональных особенностей образовавшихся макрофагов и их соотношения. Так, макрофаги с характерными признаками M2 (CD206^{high}), включая антиатерогенные CD163^{high}M-(Hb), располагаются преимущественно на периферии атеросклеротической бляшки в зоне фиброзного кольца [208]. Напротив, высокоэкспрессирующие SR-B2, HLADR, TLR и другие маркеры M1, но не CD206 (SR-E3) и CD163 (SR-I1) макрофаги с высоким провоспалительным и прокоагулянтным потенциалом, в большей степени локализуются в центральной области и плече бляшки, направленной в просвет сосуда [208]. Именно с последними типами макрофагов, по мнению ряда авторов, связано усиление провоспалительных механизмов, задействование системы свертывания крови, образования атером и других осложнений атеросклероза [37, 208]. Кроме того, клетки ядра бляшки

более насыщены холестерином, чем периферийные макрофаги, сохраняя относительно высокий уровень экспрессии основного поглотителя oxLDL — SR-A1 (CD204) [208]. При этом развитие оксидантного стресса в эндотелии и M1 способствует дополнительной модификации LDL, превращению их в лиганды SR. Напротив, преобладание CD163^{high}M-(Hb) способствует рубцеванию очага атеросклероза и восстановлению эндотелиальной выстилки сосуда [84, 195, 208]. Кроме того, экспрессия SR-L1 (CD91) на миоцитах ограничивает их пролиферацию, образование аневризмы и понижает восприимчивость к атеросклерозу [20].

Таким образом, вовлечение SR в патогенез атеросклероза носит комплексный, противоречивый и многогранный характер. Направленное действие на конкретные типы SR является перспективным методом терапии многочисленных соматических заболеваний, связанных с атеросклерозом [36, 78, 205, 208].

3.7. SR при развитии эссенциальной гипертонической болезни

Патогенез гипертонии включает три основных блока [42, 83]: 1) дисфункция нейроэндокринной системы — нарушение взаимосвязи лимбико-ретикулярного комплекса и гипоталамуса, приводящее к повышению симпатической иннервации сосудов и продукции катехоламинов в надпочечниках; 2) дисфункция ренин-ангиотензин-альдостероновой системы; 3) местные нарушения регуляции тонуса миоцитов сосудов. Кроме того, может способствовать дисфункции сосудистого тонуса диссонанс продукции адипокинов, связанный с клеточным стрессом адипоцитов при ожирении [135]. Все эти составляющие патогенеза гипертонии включают типовые проявления паравоспаления, характерные также для метаболического синдрома и нейродегенерации [42].

Центральные механизмы гипертонической болезни связаны со многими патогенетическими факторами, включая провоспалительный стресс микроглии, активацию нейронов и астроцитов в различных отделах ЦНС [29]. Взаимосвязь нейронов и клеток микроглии регулируется многими факторами. Например, аденомедуллин может ограничивать активацию микроглии и оксидантный стресс нейронов, в то время как гипоксия и провоспалительные цитокины оказывают противоположное действие [29]. В целом снижение провоспалительной активности и степени поляризации микроглии в направлении M1 протективно для купирования гипертензии [89].

Развитие тканевого стресса приводит к эндотелиозу и активации гладкомышечных клеток сократительных сосудов с участием SR (глава 2, раздел 3.5), прежде всего: SR-E1 (LOX-1), SR-B2

(CD36), SR-J1 (RAGE) и SR-G1 (CXCL16). В частности, патологическая роль LOX-1 при активации эндотелиоцитов и миоцитов, а также атерогенных липопротеинов показана в модели экспериментальной гипертензии [150]. Так, высокие концентрации oxLDL способствуют стрессу этих клеток [150]. При этом вазоконстрикторные пептиды — эндотелин-1 и ангиотензин-2 — могут включаться в порочный патогенетический круг, связывающий гипертензию и стресс клеток сократительных сосудов, опосредованный LOX-1, в то время как аденомедуллин и окись азота (NO) ему препятствуют [89].

3.8. SR при нейродегенеративных заболеваниях

Нейродегенерацию можно рассматривать как самостоятельный типовой патологический процесс, связанный со старением организма, который может приобретать специфические признаки конкретных нозологий при наличии дополнительных генетических и средовых факторов риска их возникновения [83]. К типовым проявлениям нейродегенерации можно отнести развитие клеточного стресса у нейронов и клеток глии, а также общие морфофункциональные признаки атрофии головного мозга и ряд синдромов, характерных для многих нозологий [15].

Головной мозг является облигатно гликолизующей тканью, что позволяет этому органу уклониться от липотоксичности. Однако другой особенностью мозга является необходимость поддерживать на постоянном высоком уровне биосинтез многих специализированных белков, а также образование АТФ за счет процессов аэробного распада глюкозы, что определяет высокую уязвимость нервной ткани от гипоксии и накопления aberrантных протеинов [15]. В свою очередь, эти нарушения предопределяют развитие митохондриального и оксидантного стресса, а также стресса эндоплазматического ретикула (реакция клетки на повреждение протеома), активацию процессов аутофагии и образование инфламмосом — белковых комплексов, которые способствуют продукции IL-1 β и могут инициировать пироптоз нейронов (вариант программного некроза с провоспалительной направленностью) [19, 104, 113, 123]. Эти процессы связаны с развитием сигнальных путей апоптоза или пироптоза, ускоренным старением постмитотических клеток нервной ткани и дополнительно потенцируются гипоксией, медленными вирусными инфекциями, интоксикациями и другими причинами повреждения нейронов [18, 49].

Особое значение в патогенезе нейродегенеративных заболеваний имеет отложение в нервной ткани амилоидных белков, прежде всего прионов, прионоподобных амилоидов и β -амилоидов. Амилоидные белки накаплива-

ются внутри нейронов, но при их гибели, особенно в результате пироптоза и aberrантного апоптоза — вторичного некроза (раздел 2.5), нерастворимые амилоиды могут накапливаться в межклеточном пространстве и патологически активировать микроглию [15, 18, 191]. Так, у человека выраженные проявления энцефалопатии отмечаются при развитии относительно редких генетических или инфекционных прионных заболеваний [15]. Эти заболевания связаны с конформационными изменениями нормального белка мембран нейронов — PrP^C — и его превращением в изоформу PrP^{Sc}, которая чрезвычайно устойчива к протеолизу и деградации и вызывает дальнейшее превращение белка PrP^C в PrP^{Sc}, прямо действуя на PrP^C [99]. При этом развитие процесса приобретает лавинообразный характер. Кроме этого, вероятность отложения в нейронах и межклеточном веществе прионоподобных белков и β -амилоидов возрастает при старении организма, наследственной предрасположенности и негативных факторах образа жизни человека, например при возникновении болезни Альцгеймера (отложение фосфорилированного тау-протеина и β -амилоида) и болезни Паркинсона (α -синуклеина и тау-протеина) [74].

Внеклеточные комплексы амилоидных белков связываются посредством SR с клетками микроглии и астроцитами, которые могут поглощать и утилизировать определенное количество растворимых амилоидных белков, но при накоплении их нерастворимых комплексов способствуют развитию паравоспаления, оксидантному стрессу и дальнейшему повреждению нервной ткани. При этом SR-A1 (CD204), SR-L1 (CD91) и SR-F3 участвуют в клиренсе растворимых амилоидных белков без выраженной активации микроглии [34, 110, 129, 230]. Растворимая форма рецептора SR-L1 (sCD91) способствует нейровоспалению и продукции провоспалительных цитокинов, вероятно, посредством конкуренции с мембранной формой этого рецептора [22]. Рецептор SR-B1 при болезни Альцгеймера способствует поглощению и утилизации астроцитами растворимых β -амилоидов без их существенной активации [34, 230]. При гипоксии мозга на астроцитах может снижаться экспрессия SR-B1 и SR-A6 (MARCO), что замедляет клиренс растворимых β -амилоидов и усиливает отложения внеклеточного амилоида [34, 52]. В свою очередь, SR-F3 участвует в поглощении апоптотных нейронов астроцитами и тем самым препятствует вторичному некрозу этих клеток [101].

Напротив, задействование SR-B2 (CD36), и SR-J1 (RAGE) приводит к патологической активации микроглии, а SR-J1 — непосредственно нейронов [28, 129, 230]. Кроме того, при нейро-

дегенерации атерогенные LDL могут проникать через гематоэнцефалический барьер и действовать на нейроны через SR-E1 (LOX-1), который активирует сигнальные пути транскрипционного фактора p53, способствующие выживанию или апоптозу нейронов в зависимости от ситуации [225].

Возможно и острое развитие нейродегенерации. Так, в восстановительный период экспериментального сепсиса у крыс фиксируется в гиппокампе гибель нейронов, отложение таупротейна и β -амилоида, а также развитие когнитивных расстройств [67]. При этом блокада SR-J1 (RAGE) антителами существенно снижала проявления нейродегенерации, а накоплению в мозге лигандов SR-J1, наоборот, способствовала.

Таким образом, SR играют существенную, но и противоречивую роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Целенаправленное действие на активность SR является перспективным направлением терапии этих заболеваний [28, 174].

3.9. Роль SR при развитии системного воспаления

Системное воспаление (СВ) целесообразно рассматривать с позиции самостоятельной формы общепатологического процесса, отличающегося по ряду своих атрибутов как от системной воспалительной реакции при классическом воспалении, так и от хронического системного паравоспаления [3, 83, 251]. Скорее, СВ можно определить как метавоспаление [83], суть которого заключается в системной воспалительной трансформации микроциркуляции крови, микроциркуляторных расстройствах (шокогенных состояниях) при системном действии повреждающих факторов микробной и асептической природы. При этом интенсивность действия факторов системного повреждения и гиперактивации клеток должна быть сопоставимой с их локальным действием в очаге классического воспаления. При прогрессировании СВ возникает феномен вторичного системного повреждения, делающего процесс СВ необратимым даже в условиях проведения интенсивной терапии [83, 251]. Факторами вторичного системного повреждения являются изменения многих параметров гомеостаза, связанных с полиорганной недостаточностью, накоплением в крови PAMP, DAMP, ROS, гидролаз, катионных белков, высоких концентрации IL-1 β и TNF α , продуктов внутрисосудистой активации системы комплемента и гемостаза [83]. Для предотвращения системной активации макрофагов РЭС, эндотелиоцитов и миоцитов микрососудов, приводящей к критическим для жизни шоковым состояниям, в организме существуют многочисленные факторы противовоспалительной резистент-

ности, которые могут усиливаться при развитии острофазного ответа печени и некоторых других протективных механизмов системного воспалительного ответа классического воспаления [83]. Среди этих факторов особую роль играют SR, преимущественно локализованные на клетках РЭС и эндотелии сосудов. В настоящее время данных о значении SR в развитии СВ относительно немного. Это связано как с многофункциональностью каждого отдельного SR, их взаимодействием между собой и другими рецепторами, высокой степенью избыточности и дублированием их основных функций, так и с относительно ограниченным количеством работ в этом направлении. Однако изложенные выше данные о биологии SR позволяют в целом оценить возможное протективное и негативное значение SR при СВ (табл. 2). Оно заключается в следующем:

1. Реализация фагоцитоза проникшего в системный кровоток ограниченного числа микробов из очага воспаления или при нарушении барьерной функции кишечника, без существенной провоспалительной активации РЭС [28, 83, 174, 245]. В этом случае SR могут непосредственно распознавать PAMP на патогенах или связывать их опосредованно, через молекулы адгезии плазмы крови. Например, при задействовании фибронектина SR могут участвовать в поглощении микробов и их токсинов в кооперации с интегринами — $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha v\beta 3$ [60, 91]. Такими посредниками могут быть и тромбоциты. Они не обладают достаточной бактерицидностью для завершения фагоцитоза патогенов, но способны их фиксировать и вакуолизировать [228]. После чего тромбоциты могут поглощаться макрофагами РЭС, прежде всего с помощью SR-E4 [33, 93].

2. Удаление из кровотока продуктов окисления макромолекул (большинство SR, глава 2, табл. 1), протеаз и их комплексов с антипротеазами (SL-L1) [129], продуктов гликирования — AGE (SR-A1, SR-B2, SR-E1, SR-J1 — табл. 1), тромбоцитарных агрегатов (SR-E4) [33, 94], свободного гемоглобина (SR-I1) [51, 195], нуклеиновых кислот — SR-A1 и других SR, распознающих полианионы (табл. 1) других макромолекул, включая DAMP, поддерживающих системное повреждение. Распознавание этих факторов осуществляется SR непосредственно или при участии вспомогательных молекул, гаптоглобина, других острофазных белков, фибронектина, гепарина, продуктов деградации гликокаликса эндотелиоцитов — гепарансульфата (глава 1, табл. 1). В частности, подобно гепарину, гепарансульфат связывает катионные белки — дефенсины и катепсины фагоцитов, ядерный DAMP — HMGB1 [161]. Затем образовавшиеся комплексы могут поглощаться РЭС, после фиксации на SR-H1/2 [68, 122, 166,

ТАБЛИЦА 2. ВОЗМОЖНОЕ ПРОТЕКТИВНОЕ И НЕГАТИВНОЕ ЗНАЧЕНИЕ SR ПРИ РАЗВИТИИ СИСТЕМОГО ВОСПАЛЕНИЯ (ОБОБЩЕННЫЕ ДАННЫЕ ГЛАВЫ 2, РАЗДЕЛОВ 3.1. И 3.9, ТАБЛИЦЫ 1)

TABLE 2. POSSIBLE PROTECTIVE AND NEGATIVE SIGNIFICANCE OF SR IN THE DEVELOPMENT OF SYSTEMIC INFLAMMATION (SUMMARIZED DATA OF CHAPTER 2, SECTIONS 3.1, 3.9, AND TABLE 1)

Протективное значение SR при СВ Protective value of SR under SI	
Механизм Mechanisms	SR
Распознавание PAMP, участие в фагоцитозе патогенов PAMPs recognition, phagocytosis of pathogens	A1, A6, B1, B2, E2, E3, E4 ¹ , F1, F2, G1, H1, H2, I1, J1, SSC5D, CD209
Удаление из кровотока метаболического «мусора» Elimination of metabolic "debris" from the bloodstream	A1, A5, A6, B1, B2, D1, E1, E3, G1, J1, L1
Удаление продуктов апоптоза, поврежденных клеток Removal of apoptotic products, damaged cells	A1, A5, A6, B2, D1, E1, E3, F1, F2, G1, H1, H2, J1, L1
Удаление aberrantных тромбоцитов Elimination of aberrant platelets	E4 (основной рецептор) E4 (the main receptor)
Удаление продуктов коагуляции крови Removal of products of the blood coagulation	B2, E4, H1, H2, L1
Ограничение развития клеточного стресса Limitation of the development of cell stress	A1 ² , B1, E3, F1, H1, H2, I1, I2, L1
Удаление из кровотока свободного гемоглобина Removal of free hemoglobin from the bloodstream	I1 (преимущественно в комплексе с гаптоглобином) I1 (mainly in combination with haptoglobin)
Удаление из кровотока комплексов протеаза-антипротеаза Removal of protease-antiprotease complexes from the bloodstream	L1 (основной рецептор) L1 (the main receptor)
Удаление растворимых PAMP и DAMP Elimination of soluble PAMPs and DAMPs	A1², B1, H1³, H2³, при содействии HSP70 – (A1, E3, F1, L1)? A1 ² , B1, H1 ³ , H2 ³ , assisted by HSP70 – (A1, E3, F1, L1)?
Обеспечение продукции надпочечниками глюкокортикоидов Procurement of glucocorticoids realizing by the adrenal glands	B1
Растворимые формы SR как маркеры СВ Soluble forms of SR as markers of SI	E3 (sCD206), I1 (sCD163), sCD14 (пресепсин) E3 (sCD206), I1 (sCD163), sCD14 (presepsin)
Регенерация поврежденных органов Regeneration of damaged organs	B1, E4, F3, H1, H2, I2, K1, L1, L2
Негативная роль SR при СВ Negative role of SR under SI	
Механизм Mechanisms	SR
Патологическая активация эндотелия микрососудов Pathological activation of the microvascular endothelium	B2, E1, J1
Патологическая активация макрофагов Pathological activation of macrophages	(A1², B2, CD14) – при взаимодействии с TLR4, J1 (A1 ² , B2, CD14) – when interacting with TLR4, J1
Участие в активации тромбоцитов Participation in platelet activation	B2
Развитие сладж-феномена The development of the sludge phenomenon	B2
Септическая пролонгированная нейродегенерация Septic prolonged neurodegeneration	J1

Примечание. ¹ – после связывания микробов с тромбоцитами; ² – в определенных случаях; ³ – после связывания с гепарином и гепарансульфатом катионных DAMP.

Note. ¹, after binding of microbes with platelets; ², in certain cases; ³, after binding of DAMPs with heparin and heparan sulfate.

193]. Гаптоглобин связывает свободный гемоглобин, а затем этот комплекс распознается с помощью SR-I1 (CD163) макрофагами РЭС [51, 195]. В качестве других посредников могут выступать БТШ, особенно HSP70 [73, 143, 183]. Индуцибельные БТШ являются ключевыми шаперонами клеточного стресса при различных патологиях человека [206]. Они связываются с поврежденными белками и нормализуют их пространственную структуру или участвуют в утилизации необратимо поврежденных белков, а также выполняют широкий спектр регуляторных функций внутри клетки [40, 104, 113, 206]. Кроме того, некоторые БТШ могут секретироваться клетками иммунной системы при их активации или в больших количествах высвобождаться из некротических клеток [73]. Во внешней среде HSP70 способны связывать различные DAMP и PAMP, включая LPS, а также связываться со многими рецепторами, включая ряд SR (табл. 1) и TLR2/4 [73]. При этом показана протективная роль HSP70 при развитии СВ асептической и инфекционной природы [143, 183], но эти эффекты, по-видимому, связаны с относительно небольшими концентрациями HSP70 в крови [72]. В свою очередь, эти протективные эффекты могут быть опосредованы SR, связывающими HSP70, другие БТШ и ограничивающими развитие клеточного стресса макрофагов (глава 1, табл. 1). Однако высказанное предположение, для своего подтверждения нуждается в дополнительных экспериментальных исследованиях. Также стромальные макрофаги удаляют из крови и лимфоидных органов апоптотные и поврежденные клетки, при участии многих SR, посредством распознавания на их поверхности полианионов, фосфатидилсерина, C1q, поврежденных структур гликокаликса, БТШ и других лигандов (глава 2, табл. 1) [28, 167, 174, 245, 248].

3. Протективные эффекты SR также связаны с ограничением развития системного провоспалительного тканевого стресса [83], а также с регенерацией поврежденных тканей в восстановительный период СВ (раздел 3.1). Среди SR в этом случае можно особо выделить SR-B1, протективная функция которого при развитии СВ носит многоплановый характер. Однако преимущественно исследована роль SR-B1 только при сепсисе — инфекционном варианте СВ (раздел 2.2) [72, 81, 82]. В целом контролируемые SR проявления тканевого стресса, адекватные повреждающему фактору и состоянию организма, являются благоприятным условием купирования последствий тяжелой травмы или инфекции, предотвращения и разрешения СВ.

4. Если действия факторов системного повреждения превышают адаптационные возможности

SR и других защитных механизмов, некоторые из них, включая TLR и отдельные SR, приобретают дисфункциональный характер и вовлекаются в порочный патогенетический круг развития СВ (табл. 2). Так, SR-A1 совершает функциональный переворот от противовоспалительных свойств к провоспалительными, усугубляя течения СВ, а именно, подобно SR-B2 (CD36) и CD14, он становится корецептором для TLR4 макрофагов, ухудшая течение экспериментального сепсиса [45, 110, 162]. В свою очередь, SR-J1 (RAGE) способствует патологической активации эндотелия сосудов и других клеток в качестве неблагоприятного фактора развития сепсиса и других критических состояний [128, 186]. Кроме того, SR-J1 может способствовать вторичному развитию нейродегенерации в восстановительный период сепсиса, реагируя на образование амилоидных белков в головном мозге [67]. Также в экспериментальных моделях сепсиса доказана негативная роль для выживания животных и развития микроциркуляторных расстройств SR-E1 (LOX-1) и их лиганда — oxLDL [8]. В свою очередь, SR-B2 участвует в патологической активации не только макрофагов, но также эндотелиоцитов и тромбоцитов, способствует внутрисосудистому свертыванию крови [90, 207, 238], а также экспрессируется на поврежденных эритроцитах, способствуя развитию сладж-феномена [41].

Таким образом, SR обладают протективными свойствами при развитии СВ, а именно предотвращают трансформацию классического воспаления в системное, оптимизируют проявления системной воспалительной реакции, системного тканевого стресса, являются механизмами удаления факторов повреждения из кровотока и участвуют в восстановлении поврежденных органов. Растворимые формы некоторых SR уже используются (sCD14 — пресепсин) [124, 252] или могут эффективно использоваться (sCD163 [55], sCD206 [18]) для диагностики и мониторинга сепсиса и других критических состояний человека. Однако некоторые SR способствуют необратимости процесса СВ при его эскалации и развитию вторичных осложнений посредством участия в патологической активации эндотелия сосудов, тромбоцитов, макрофагов РЭС и паренхиматозных клеток печени и головного мозга. В целом влияние SR на процессы СВ весьма многообразно и их механизмы пока еще далеко не до конца изучены.

Заключение

Биологические механизмы SR обеспечивают взаимосвязь различных физиологических процессов, включая процессы нейроэндокринной и метаболической регуляции, с иммунной си-

стемой. Эти механизмы лежат на границе нормы и патологии, а именно при переходе физиологического тканевого стресса в дисфункциональный. Они являются одними из ключевых факторов патогенеза различных соматических заболеваний, связанных с хроническим воспалением низкой интенсивности. Также они вовлечены в процессы опухолевой трансформации и противоопухолевого иммунитета, в различные процессы классического воспаления — начиная с презентации антигенов дендроцитами и заканчивая процессами морфофункциональной поляризации макрофа-

гов и Т-клеток в очаге воспаления. Важную про-тективную, а в некоторых случаях и негативную роль играют SR в предотвращении развития и в разрешении системного воспаления — главной причины летальных исходов в палатах интенсивной терапии. Целенаправленное действие на SR является перспективным направлением терапии очень широкого круга заболеваний, а определение мембранных и растворимых форм SR уже в настоящее время используется в качестве метода диагностики и мониторинга многих патологий человека.

Список литературы / References

1. Головкин А.С., Асадуллина И.А., Кудрявцев И.В. Пуринергическая регуляция основных физиологических и патологических процессов // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 463-476. [Golovkin A.S., Asadullina I.A., Kudryavtsev I.V. Purinergic regulation of basic physiological and pathological processes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 463-476. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-463-476.
2. Гусев Е.Ю., Журавлева Ю.А., Зотова Н.В. Взаимосвязь эволюции иммунитета и воспаления у позвоночных // Успехи современной биологии, 2019. Т. 139, № 1. С. 59-74. [Gusev E.Yu., Zhuravleva Yu.A., Zotova N.V. Correlation of immunity evolution and inflammation in vertebrates. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2019, Vol. 139, no. 1, pp. 59-74 (In Russ.)]
3. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 1-2. С. 9-20. [Chereshnev V.A., Gusev E.Yu. Immunological and pathophysiological mechanisms of systemic inflammation. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 1-2, pp. 9-20. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-1-2-9-20.
4. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Elsevier, 2018. 579 p.
5. Acton S., Resnick D., Freeman M., Ekel Y., Ashkenas J., Krieger M. The collagenous domains of macrophage scavenger receptors and complement component C1q mediate their similar, but not identical, binding specificities for polyanionic ligands. *J. Biol. Chem.*, 1993, Vol. 268, no. 5, pp. 3530-3537.
6. Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T., Xu S., Hobbs H.H., Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 1996, Vol. 271, no. 5248, pp. 518-520.
7. Adachi H., Tsujimoto M. FEEL-1, a novel scavenger receptor with *in vitro* bacteria-binding and angiogenesis-modulating activities. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, no. 37, pp. 34264-34270.
8. Al-Banna N., Lehmann C. Oxidized LDL and LOX-1 in experimental sepsis. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, 761789. doi: 10.1155/2013/761789.
9. Alvarado-Vazquez P.A., Bernal L., Paige C.A., Grosick R.L., Moracho Vilrriales C., Ferreira D.W., Ulecia-Morón C., Romero-Sandoval E.A. Macrophage-specific nanotechnology-driven CD163 overexpression in human macrophages results in an M2 phenotype under inflammatory conditions. *Immunobiology*, 2017, Vol. 222, no. 8-9, pp. 900-912.
10. Armengol C., Bartolí R., Sanjurjo L., Serra I., Amézaga N., Sala M., Sarrias M.R. Role of scavenger receptors in the pathophysiology of chronic liver diseases. *Crit. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 33, no. 1, pp. 57-96.
11. Arredouani M., Yang Z., Ning Y., Qin G., Soininen R., Tryggvason K., Kobzik L. The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J. Exp. Med.*, 2004, Vol. 200, no. 2, pp. 267-272.
12. Asea A., Rehli M., Kabingu E., Boch J.A., Bare O., Auron P.E., Stevenson M.A., Calderwood S.K. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, no. 17, pp. 15028-15034.
13. Baid K., Nellimarla S., Huynh A., Boulton S., Guarné A., Melacini G., Collins S.E., Mossman K.L. Direct binding and internalization of diverse extracellular nucleic acid species through the collagenous domain of class A scavenger receptors. *Immunol. Cell Biol.*, 2018, Vol. 96, no. 9, pp. 922-934.
14. Balzan S., Lubrano V. LOX-1 receptor: A potential link in atherosclerosis and cancer. *Life Sci.*, 2018, Vol. 198, pp. 79-86.
15. Baquero M., Martin N. Depressive symptoms in neurodegenerative diseases. *World J. Clin. Cases*, 2015, Vol. 3, no. 8, pp. 682-693.
16. Bergheanu S.C., Bodde M.C., Jukema J.W. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis: Current view and future perspective on lipoprotein modification treatment. *Neth. Heart J.*, 2017, Vol. 25, no. 4, pp. 231-242.

17. Berwin B., Hart J.P., Rice S., Gass C., Pizzo S.V., Post S.R., Nicchitta C.V. Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *EMBO J.*, 2003, Vol. 22, pp. 6127-6136.
18. Bisht K., Sharma K., Tremblay M.È. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress. *Neurobiol. Stress*, 2018, Vol. 9, pp. 9-21.
19. Biswas S.K. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2016, Vol. 2016, 5698931. doi: 10.1155/2016/5698931.
20. Boucher P., Gotthardt M., Li W.P., Anderson R.G., Herz J. Science. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science*, 2003, Vol. 300, no. 5617, pp. 329-332.
21. Boullier A., Bird D.A., Chang M.K., Dennis E.A., Friedman P., Gillotre-Taylor K., Hörkö S., Palinski W., Quehenberger O., Shaw P., Steinberg D., Terpstra V., Witztum J.L. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2001, Vol. 947, pp. 214-223.
22. Brifault C., Gilder A.S., Laudati E., Banki M., Gonias S.L. Shedding of membrane-associated LDL receptor-related protein-1 from microglia amplifies and sustains neuroinflammation. *J. Biol. Chem.*, 2017, Vol. 292, no. 45, pp. 18699-18712.
23. Broders-Bondon F., Nguyen Ho-Boulidoires T.H., Fernandez-Sanchez M.E., Farge E. Mechanotransduction in tumor progression: The dark side of the force. *J. Cell Biol.*, 2018, Vol. 217, no. 5, pp. 1571-1587.
24. Brown M.S., Goldstein J.L. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, Vol. 76, no. 7, pp. 3330-3337.
25. Bruneau N., Richard S., Silvy F., Verine A., Lombardo D. Lectin-like Ox-LDL receptor is expressed in human INT-407 intestinal cells: involvement in the transcytosis of pancreatic bile salt-dependent lipase. *Mol. Biol. Cell*, 2003, Vol. 14, no. 7, pp. 2861-2875.
26. Butler M., Morel A.S., Jordan W.J., Eren E., Hue S., Shrimpton R.E., Ritter M.A. Altered expression and endocytic function of CD205 in human dendritic cells, and detection of a CD205-DCL-1 fusion protein upon dendritic cell maturation. *Immunology*, 2007, Vol. 120, no. 3, pp. 362-371.
27. Cai L., Wang Z., Ji A., Meyer J.M., van der Westhuyzen D.R. Scavenger receptor CD36 expression contributes to adipose tissue inflammation and cell death in diet-induced obesity. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 5, e36785. doi: 10.1371/journal.pone.0036785.
28. Canton J., Neculai D., Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 9, pp. 621-634.
29. Carniglia L., Ramírez D., Durand D., Saba J., Turati J., Caruso C., Scimonelli T.N., Lasaga M. Neuropeptides and microglial activation in inflammation, pain, and neurodegenerative diseases. *Mediators Inflamm.*, 2017, Vol. 2017, 5048616. doi: 10.1155/2017/5048616.
30. Chen C.K., Chan N.L., Wang A.H. The many blades of the β -propeller proteins: conserved but versatile. *Trends Biochem. Sci.*, 2011, Vol. 36, no. 10, pp. 553-561.
31. Chimal-Ramírez G.K., Espinoza-Sánchez N.A., Chávez-Sánchez L., Arriaga-Pizano L., Fuentes-Pananá E.M. Monocyte differentiation towards protumor activity does not correlate with M1 or M2 phenotypes. *J. Immunol. Res.*, 2016, Vol. 2016, 6031486. doi: 10.1155/2016/6031486.
32. Chistiakov D.A., Killingsworth M.C., Myasoedova V.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab. Invest.*, 2017, Vol. 97, no. 1, pp. 4-13.
33. Cho J., Kim H., Song J., Cheong J.W., Shin J.W., Yang W.I., Kim H.O. Platelet storage induces accelerated desialylation of platelets and increases hepatic thrombopoietin production. *J. Transl. Med.*, 2018, Vol. 16, no. 1, 199. doi: 10.1186/s12967-018-1576-6.
34. Cornejo F., von Bernhardi R. Role of scavenger receptors in glia-mediated neuroinflammatory response associated with Alzheimer's disease. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, 895651. doi: 10.1155/2013/895651.
35. Creagh E.M., O'Neill L.A. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.*, 2006, Vol. 27, no. 8, pp. 352-357.
36. Dai Y., Condorelli G., Mehta J.L. Scavenger receptors and non-coding RNAs: relevance in atherogenesis. *Cardiovasc. Res.*, 2016, Vol. 109, no. 1, pp. 24-33.
37. de Paoli F., Staels B., Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis. *Circ. J.*, 2014, Vol. 78, no. 8, pp. 1775-1781.
38. de Siqueira J., Abdul Zani I., Russell D.A., Wheatcroft S.B., Ponnambalam S., Homer-Vanniasinkam S. Clinical and preclinical use of LOX-1-specific antibodies in diagnostics and therapeutics. *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, 2015, Vol. 8, no. 8, pp. 458-465.
39. de Witte L., Nabatov A., Pion M., Fluitsma D., de Jong M.A., de Gruijl T., Piguet V., van Kooyk Y., Geijtenbeek T.B. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 3, pp. 367-371.
40. Deitch E.A., Condon M., Feketeova E., Machiedo G.W., Mason L., Vinluan G.M., Alli V.A., Neal M.D., Tomai J.N., Fishman J.E., Durán W.N., Spolarics Z. Trauma-hemorrhagic shock induces a CD36-dependent RBC endothelial-adhesive phenotype. *Crit. Care Med.*, 2014, Vol. 42, no. 3, pp. e200-e210.
41. Delia D., Mizutani S. The DNA damage response pathway in normal hematopoiesis and malignancies. *Int. J. Hematol.*, 2017, Vol. 106, no. 3, pp. 328-334.
42. DeMarco V.G., Aror A.R., Sowers J.R. The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2014, Vol. 10, no. 6, pp. 364-376.

43. den Dunnen J., Gringhuis S.I., Geijtenbeek T.B.H. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2009, Vol. 58, no. 7, pp. 1149-1157.
44. Deng L., Chen N., Li Y., Zheng H., Lei Q. CXCR6/CXCL16 functions as a regulator in metastasis and progression of cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, Vol. 1806, no. 1, pp. 42-49.
45. Drummond R., Cauvi D.M., Hawisher D., Song D., Niño D.F., Coimbra R., Bickler S., De Maio A. Deletion of scavenger receptor A gene in mice resulted in protection from septic shock and modulation of TLR4 signaling in isolated peritoneal macrophages. *Innate Immun.*, 2013, Vol. 19, no. 1, pp. 30-41.
46. Dunkel J., Viitala M., Karikoski M., Rantakari P., Virtakoivu R., Elimä K., Hollmén M., Jalkanen S., Salmi M. Enhanced Antibody Production in Clever-1/Stabilin-1-Deficient Mice. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2257. doi: 10.3389/fimmu.2018.02257.
47. Dunne D.W., Resnick D., Greenberg J., Krieger M., Joiner K.A. The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, Vol. 91, no. 5, pp. 1863-1867.
48. Elewa U., Sanchez-Niño M.D., Mahillo-Fernández I., Martin-Cleary C., Belen Sanz A., Perez-Gomez M.V., Fernandez-Fernandez B., Ortiz A. Circulating CXCL16 in Diabetic Kidney Disease. *Kidney Blood Press. Res.*, 2016, Vol. 41, no. 5, pp. 663-671.
49. Emard J.F., Thouez J.P., Gauvreau D. Neurodegenerative diseases and risk factors: a literature review. *Soc. Sci. Med.*, 1995, Vol. 40, no. 6, pp. 847-858.
50. Etzerodt A., Maniecki M.B., Graversen J.H., Møller H.J., Torchilin V.P., Moestrup S.K. Efficient intracellular drug-targeting of macrophages using stealth liposomes directed to the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J. Control Release*, 2012, Vol. 160, no. 1, pp. 72-80.
51. Etzerodt A., Moestrup S.K. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid. Redox Signal*, 2013, Vol. 18, no. 17, pp. 2352-2363.
52. Eugénin J., Vecchiola A., Murgas P., Arroyo P., Cornejo F., von Bernhardi R. Expression pattern of scavenger receptors and amyloid- β phagocytosis of astrocytes and microglia in culture are modified by acidosis: implications for alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2016, Vol. 53, no. 3, pp. 857-873.
53. Fabrick B.O., van Bruggen R., Deng D.M., Ligtenberg A.J., Nazmi K., Schornagel K., Vloet R.P., Dijkstra C.D., van den Berg T.K. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 4, pp. 887-892.
54. Febbraio M., Hajjar D.P., Silverstein R.L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.*, 2001, Vol. 108, no. 6, pp. 785-791.
55. Feng L., Zhou X., Su L.X., Feng D., Jia Y.H., Xie L.X. Clinical significance of soluble hemoglobin scavenger receptor CD163 (sCD163) in sepsis, a prospective study. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 7, e38400. doi: 10.1371/journal.pone.0038400.
56. Finn A.V., Nakano M., Polavarapu R., Karmali V., Saeed O., Zhao X., Yazdani S., Otsuka F., Davis T., Habib A., Narula J., Kolodgie F.D., Virmani R. Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2012, Vol. 59, no. 2, pp. 166-177.
57. Fisher C.E., Howie S.E. The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Dev. Biol.*, 2006, Vol. 296, no. 2, pp. 279-297.
58. Flacher V., Douillard P., Aït-Yahia S., Stoitzner P., Clair-Moninot V., Romani N., Saeland S. Expression of langerin/CD207 reveals dendritic cell heterogeneity between inbred mouse strains. *Immunology*, 2008, Vol. 123, no. 3, pp. 339-347.
59. Flütsch A., Henry K., Mantuano E., Lam M.S., Shibayama M., Takahashi K., Gonias S.L., Campana W.M. Evidence that LDL receptor-related protein 1 acts as an early injury detection receptor and activates c-Jun in Schwann cells. *Neuroreport*, 2016, Vol. 27, no. 18, pp. 1305-1311.
60. Foster T.J. The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of Staphylococcus aureus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2016, Vol. 35, no. 12, pp. 1923-1931.
61. Fowler D.E., Yang S., Zhou M., Chaudry I.H., Simms H.H., Wang P.J. Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1: their role in the septic response. *Surg. Res.*, 2003, Vol. 109, no. 2, pp. 175-181.
62. Franceschi C., Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2014, Vol. 69, Suppl. 1, pp. S4-S9.
63. Frenkel D., Wilkinson K., Zhao L., Hickman S.E., Means T.K., Puckett L., Farfara D., Kingery N.D., Weiner H.L., El Khoury J. Scara1 deficiency impairs clearance of soluble amyloid- β by mononuclear phagocytes and accelerates Alzheimer's-like disease progression. *Nat. Commun.*, 2013, Vol. 4, p. 2030.
64. Gaertner F., Ahmad Z., Rosenberger G., Fan S., Nicolai L., Busch B., Yavuz G., Luckner M., Ishikawa-Ankerhold H., Hennel R., Benechet A., Lorenz M., Chandraratne S., Schubert I., Helmer S., Striednig B., Stark K., Janko M., Böttcher R.T., Verschoor A., Leon C., Gachet C., Gudermann T., Mederos Y., Schnitzler M., Pincus Z., Iannacone M., Haas R., Wanner G., Lauber K., Sixt M., Massberg S. Migrating platelets are mechano-scavengers that collect and bundle bacteria. *Cell*, 2017, Vol. 171, no. 6, pp. 1368-1382.
65. Garg A.D., Romano E., Rufo N., Agostinis P. Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anticancer therapy: mechanisms and clinical translation. *Cell Death Differ.*, 2016, Vol. 23, no. 6, pp. 938-951.
66. Garton T., Keep R.F., Hua Y., Xi G. CD163, a hemoglobin/haptoglobin scavenger receptor, after intracerebral hemorrhage: functions in microglia/macrophages versus neurons. *Transl. Stroke Res.*, 2017, Vol. 8, no. 6, pp. 612-616.

67. Gasparotto J., Girardi C.S., Somensi N., Ribeiro C.T., Moreira J.C.F., Michels M., Sonai B., Rocha M., Steckert A.V., Barichello T., Quevedo J., Dal-Pizzol F., Gelain D.P. Receptor for advanced glycation end products mediates sepsis-triggered amyloid- β accumulation, Tau phosphorylation, and cognitive impairment. *J. Biol. Chem.*, 2018, Vol. 293, no. 1, pp. 226-244.
68. Gaus H., Miller C.M., Seth P.P., Harris E.N. Structural determinants for the interactions of chemically modified nucleic acids with the Stabilin-2 clearance receptor. *Biochemistry*, 2018, Vol. 57, no. 14, pp. 2061-2064.
69. Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 2010, Vol. 327, no. 5966, pp. 656-661.
70. Gensel J.C., Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.*, 2015, no. 1619, pp. 1-11.
71. Georgoudaki A.M., Prokopec K.E., Boura V.F., Hellqvist E., Sohn S., Östling J., Dahan R., Harris R.A., Rantalainen M., Klevebring D., Sund M., Brage S.E., Fuxe J., Rolny C., Li F., Ravetch J.V., Karlsson M.C. Reprogramming tumor-associated macrophages by antibody targeting inhibits cancer progression and metastasis. *Cell. Rep.*, 2016, Vol. 15, no. 9, pp. 2000-2011.
72. Gilibert S., Galle-Treger L., Moreau M., Saint-Charles F., Costa S., Ballaire R., Couvert P., Carrié A., Lesnik P., Huby T. Adrenocortical scavenger receptor class B type I deficiency exacerbates endotoxic shock and precipitates sepsis-induced mortality in mice. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 2, pp. 817-826.
73. Giuliano J.S. Jr., Lahni P.M., Wong H.R., Wheeler D.S. Pediatric Sepsis – Part V: Extracellular heat shock proteins: adalms for the host immune system. *Open Inflamm. J.*, 2011, Vol. 4, pp. 49-60.
74. Goedert M. Alzheimer's and Parkinson's diseases: the prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science*, 2015, Vol. 349, no. 6248, 1255555. doi: 10.1126/science.1255555.
75. Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K., Brown M.S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, Vol. 76, no. 1, pp. 333-337.
76. Gong J., Zhu B., Murshid A., Adachi H., Song B., Lee A., Liu C., Calderwood S.K. T cell activation by heat shock protein 70 vaccine requires TLR signaling and scavenger receptor expressed by endothelial cells-1. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 5, pp. 3092-3098.
77. Goodridge H.S., Reyes C.N., Becker C.A., Katsumoto T.R., Ma J., Wolf A.J., Bose N., Chan A.S., Magee A.S., Danielson M.E., Weiss A., Vasilakos J.P., Underhill D.M. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature*, 2011, Vol. 472, no. 7344, pp. 471-475.
78. Goyal T., Mitra S., Khaidakov M., Wang X., Singla S., Ding Z., Liu S., Mehta J.L. Current concepts of the role of oxidized LDL receptors in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2012, Vol. 14, pp. 150-159.
79. Gronlund J., Vitved L., Lausen M., Skjodt K., Holmskov U. Cloning of a novel scavenger receptor cysteine-rich type I transmembrane molecule (M160) expressed by human macrophages. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 165, no. 11, pp. 6406-6415.
80. Grove T.Z., Cortajarena A.L., Regan L. Ligand binding by repeat proteins: natural and designed. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2008, Vol. 18, no. 4, pp. 507-515.
81. Guo L., Song Z., Li M., Wu Q., Wang D., Feng H., Bernard P., Daugherty A., Huang B., Li X.A. Scavenger receptor BI protects against septic death through its role in modulating inflammatory response. *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284, no. 30, pp. 19826-19834.
82. Guo L., Zheng Z., Ai J., Huang B., Li X.A. Hepatic scavenger receptor BI protects against polymicrobial-induced sepsis through promoting LPS clearance in mice. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, no. 21, pp. 14666-14673.
83. Gusev E.Yu., Zotova N.V. Cellular stress and general pathological processes. *Curr. Pharmac. Design*, 2019, Vol. 25, pp. 251-297.
84. Habib A., Finn A.V. The role of iron metabolism as a mediator of macrophage inflammation and lipid handling in atherosclerosis. *Front. Pharmacol.*, 2014, Vol. 5, p. 195.
85. Hajer G.R., van Haeften T.W., Visseren F.L. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur. Heart. J.*, 2008, Vol. 29, no. 24, pp. 2959-2971.
86. Hampton R.Y., Golenbock D.T., Penman M., Krieger M., Raetz C.R. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature*, 1991, Vol. 352, pp. 342-344.
87. Han H.J., Tokino T., Nakamura Y. CSR, a scavenger receptor-like protein with a protective role against cellular damage caused by UV irradiation and oxidative stress. *Human Mol. Genet.*, 1998, Vol. 7, no. 6, pp. 1039-1046.
88. Han X.Q., Gong Z.J., Xu S.Q., Li X., Wang L.K., Wu S.M., Wu J.H., Yang H.F. Advanced glycation end products promote differentiation of CD4(+) T helper cells toward pro-inflammatory response. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.*, 2014, Vol. 34, no. 1, pp. 10-17.
89. Harwani S.C. Macrophages under pressure: the role of macrophage polarization in hypertension. *Transl. Res.*, 2018, Vol. 191, pp. 45-63.
90. Heit B., Kim H., Cosío G., Castaño D., Collins R., Lowell C.A., Kain K.C., Trimble W.S., Grinstein S. Multimolecular signaling complexes enable Syk-mediated signaling of CD36 internalization. *Dev. Cell.*, 2013, Vol. 24, no. 4, pp. 372-383.
91. Helming L., Winter J., Gordon S. The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion. *J. Cell Sci.*, 2009, Vol. 122, Pt 4, pp. 453-459.

92. Henderson B., Nair S., Pallas J., Williams M.A. Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2011, Vol. 35, no. 1, pp. 147-200.
93. Hirahara K., Nakayama T. CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int. Immunol.*, 2016, Vol. 28, no. 4, pp. 163-171.
94. Hoffmeister K.M., Falet H. Platelet clearance by the hepatic Ashwell-Morrell receptor: mechanisms and biological significance. *Thromb Res.*, 2016, Vol. 141, Suppl. 2, pp. S68-S72.
95. Holm D., Fink D.R., Steffensen M.A., Schlosser A., Nielsen O., Moeller J.B., Holmskov U. Characterization of a novel human scavenger receptor cysteine-rich molecule SCART1 expressed by lymphocytes. *Immunobiology*, 2013, Vol. 218, no. 3, pp. 408-417.
96. Holmskov U., Malhotra R., Sim R.B., Jensenius J.C. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol. Today*, 1994, Vol. 15, no. 2, pp. 67-74.
97. Holness C.L., Simmons D.L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*, 1993, Vol. 81, no. 6, pp. 1607-1613.
98. Huber O., Sumper M. Algal-CAMs: isoforms of a cell adhesion molecule in embryos of the alga *Volvox* with homology to *Drosophila* fasciclin I. *EMBO J.*, 1994, Vol. 13, no. 18, pp. 4212-4222.
99. Imran M., Mahmood S. An overview of human prion diseases. *Viol. J.*, 2011, Vol. 8, 559. doi: 10.1186/1743-422X-8-559.
100. Ingersoll M.A., Spanbroek R., Lottaz C., Gautier E.L., Frankenberger M., Hoffmann R., Lang R., Haniffa M., Collin M., Tacke F., Habenicht A.J., Ziegler-Heitbrock L., Randolph G.J. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*, 2010, Vol. 115, pp. e10-e19.
101. Iram T., Ramirez-Ortiz Z., Byrne M.H., Coleman U.A., Kingery N.D., Means T.K., Frenkel D., El Khoury J. Megf10 is a receptor for C1Q that mediates clearance of apoptotic cells by astrocytes. *J. Neurosci.*, 2016, Vol. 36, no. 19, pp. 5185-5192.
102. Ishii J., Adachi H., Aoki J., Koizumi H., Tomita S., Suzuki T., Tsujimoto M., Inoue K., Arai H. SREC-II, a new member of the scavenger receptor type F family, trans-interacts with SREC-I through its extracellular domain. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, no. 42, pp. 39696-39702.
103. Jiang Y., Oliver P., Davies K., Platt N. Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2006, Vol. 281, no. 17, pp. 11834-11845.
104. Jones D.P., Go Y-M. Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes Obes. Metab.*, 2010, Vol. 12, no. 2, pp. 116-125.
105. Józefowski S., Arredouani M., Sulahian T., Kobzik L. Disparate regulation and function of the class A scavenger receptors SR-AI/II and MARCO. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 12, pp. 8032-8041.
106. Kaku Y., Imaoka H., Morimatsu Y., Komohara Y., Ohnishi K., Oda H., Takenaka S., Matsuoka M., Kawayama T., Takeya M., Hoshino T. Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 1, e87400. doi: 10.1371/journal.pone.0087400.
107. Kato M., Neil T.K., Clark G.J., Morris C.M., Sorg R.V., Hart D.N. cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigen-uptake receptor on dendritic cells. *Immunogenetics*, 1998, Vol. 47, no. 6, pp. 442-450.
108. Ke L.Y., Chan H.C., Chan H.C., Kalu F.C.U., Lee H.C., Lin I.L., Jhuo S.J., Lai W.T., Tsao C.R., Sawamura T., Dixon R.A., Chen C.H., Chu C.S., Shin S.J. Electronegative low-density lipoprotein L5 induces adipose tissue inflammation associated with metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2017, Vol. 102, no. 12, pp. 4615-4625.
109. Kee J.Y., Ito A., Hojo S., Hashimoto I., Igarashi Y., Tsuneyama K., Tsukada K., Irimura T., Shibahara N., Takasaki I., Inujima A., Nakayama T., Yoshie O., Sakurai H., Saiki I., Koizumi K. CXCL16 suppresses liver metastasis of colorectal cancer by promoting TNF- α -induced apoptosis by tumor-associated macrophages. *BMC Cancer*, 2014, Vol. 14, 949. doi: 10.1186/1471-2407-14-949.
110. Kelley J.L., Ozment T.R., Li C., Schweitzer J.B., Williams D.L. Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease. *Crit. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 34, no. 3, pp. 241-261.
111. Khaidakov M., Mitra S., Kang B.Y., Wang X., Kadlubar S., Novelli G., Raj V., Winters M., Carter W.C., Mehta J.L. Oxidized LDL receptor 1 (OLR1) as a possible link between obesity, dyslipidemia and cancer. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 5, e20277. doi: 10.1371/journal.pone.0020277.
112. Khoo U.S., Chan K.Y., Chan V.S., Lin C.L. DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNS for infection. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2008, Vol. 86, no. 8, pp. 861-874.
113. Klionsky D.J., Baehrecke E.H., Brumell J.H., Chu C.T., Codogno P., Cuervo A.M., Debnath J., Deretic V., Elazar Z., Eskelinen E.L., Finkbeiner S., Fueyo-Margareto J., Gewirtz D., Jäättelä M., Kroemer G., Levine B., Melia T.J., Mizushima N., Rubinstein D.C., Simonsen A., Thorburn A., Thumm M., Tooze S.A. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy*, 2011, Vol. 7, no. 11, pp. 1273-1294.
114. Kneidl J., Löffler B., Erat M.C., Kalinka J., Peters G., Roth J., Barczyk K. Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* via binding of specific fibronectin peptides. *Cell Microbiol.*, 2012, Vol. 14, no. 6, pp. 914-936.
115. Knudson C.B. Hyaluronan and CD44: strategic players for cell-matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly. *Birth Defects Res. C. Embryo Today*, 2003, Vol. 69, no. 2, pp. 174-196.

116. Kodama T., Freeman M., Rohrer L., Zabrecky J., Matsudaira P., Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains α -helical and collagen-like coiled coils. *Nature*, 1990, Vol. 343, pp. 531-535.
117. Kosswig N., Rice S., Daugherty A., Post S.R. Class A scavenger receptor-mediated adhesion and internalization require distinct cytoplasmic domains. *JBC*, 2003, Vol. 278, pp. 34219-34225.
118. Kraal G., van der Laan L., Elomaa O., Tryggvason K. The macrophage receptor MARCO. *Microbes Infect.*, 2000, Vol. 2, no. 3, pp. 313-316.
119. Kristiansen L.V., Hortsch M. Fasciclin II: the NCAM ortholog in *Drosophila melanogaster*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010, Vol. 663, pp. 387-401.
120. Kubota K., Moriyama M., Furukawa S., Rafiul H.A.S.M., Maruse Y., Jinno T., Tanaka A., Ohta M., Ishiguro N., Yamauchi M., Sakamoto M., Maehara T., Hayashida J.N., Kawano S., Kiyoshima T., Nakamura S. CD163⁺CD204⁺ tumor-associated macrophages contribute to T cell regulation via interleukin-10 and PD-L1 production in oral squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 1755. doi:10.1038/s41598-017-01661-z.
121. 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.
122. Kzhyshkowska J., Gratchev A., Goerdt S. Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions. *J. Cell Mol. Med.*, 2006, Vol. 10, no. 3, pp. 635-649.
123. Lamkanfi M., Dixit V.M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 2014, Vol. 157, pp. 1013-1022.
124. Lee M.Y., Huang C.H., Kuo C.J., Lin C.L., Lai W.T., Chiou S.H. Clinical proteomics identifies urinary CD14 as a potential biomarker for diagnosis of stable coronary artery disease. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 2, e0117169. doi: 10.1371/journal.pone.0117169.
125. Lee S.A., Kwak M.S., Kim S., Shin J.S. The role of high mobility group box 1 in innate immunity. *Yonsei Med. J.*, 2014, Vol. 55, no. 5, pp. 1165-1176.
126. Lee W., Park S.Y., Yoo Y., Kim S.Y., Kim J.E., Kim S.W., Seo Y.K., Park E.K., Kim I.S., Bae J.S. Macrophagic Stabilin-1 restored disruption of vascular integrity caused by sepsis. *Thromb. Haemost.*, 2018, Vol. 118, no. 10, pp. 1776-1789.
127. Ley K., Pramod A.B., Croft M., Ravichandran K.S., Ting J.P. How mouse macrophages sense what is going on. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 204. doi: 10.3389/fimmu.2016.00204.
128. Liliensiek B., Weigand M.A., Bierhaus A., Nicklas W., Kasper M., Hofer S., Plachky J., Gröne H.J., Kurschus F.C., Schmidt A.M., Yan S.D., Martin E., Schleicher E., Stern D.M., Hämmerling G. Gü, Nawroth P.P., Arnold B. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J. Clin. Invest.*, 2004, Vol. 113, no. 11, pp. 1641-1650.
129. Lillis A.P., van Duyn L.B., Murphy-Ullrich J.E., Strickland D.K. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev.*, 2008, Vol. 88, no. 3, pp. 887-918.
130. Lloyd C.M., Hessel E.M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 12, pp. 838-848.
131. Lozano F., Martínez-Florensa M. Commentary: The scavenger receptor SSc5D physically interacts with bacteria through the SRCR-containing N-terminal domain. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 366. doi: 10.3389/fimmu.2017.00366.
132. Luckheeram R.V., Zhou R., Verma A.D., Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, Vol. 2012, 925135. doi: 10.1155/2012/925135.
133. Lupas A.N., Gruber M. The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv. Protein Chem.*, 2005, Vol. 70, pp. 37-78.
134. Ma K., Xu Y., Wang C., Li N., Li K., Zhang Y., Li X., Yang Q., Zhang H., Zhu X., Bai H., Ben J., Ding Q., Li K., Jiang Q., Xu Y., Chen Q. A cross talk between class A scavenger receptor and receptor for advanced glycation end-products contributes to diabetic retinopathy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2014, Vol. 307, no. 12, pp. E1153-E1165.
135. Maenhaut N., van de Voorde J. Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med.*, 2011, Vol. 9, 25. doi: 10.1186/1741-7015-9-25.
136. Mahajan A., Herrmann M., Muñoz L.E. Clearance deficiency and cell death pathways: a model for the pathogenesis of SLE. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 35. doi: 10.3389/fimmu.2016.00035.
137. Manfredi A.A., Capobianco A., Esposito A., de Cobelli F., Canu T., Monno A., Raucci A., Sanvito F., Doglioni C., Nawroth P.P., Bierhaus A., Bianchi M.E., Rovere-Querini P., del Maschio A. Maturing dendritic cells depend on RAGE for *in vivo* homing to lymph nodes. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 4, pp. 2270-2275.
138. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, 2002, Vol. 23, no. 11, pp. 549-555.
139. Mantuano E., Brifault C., Lam M.S., Azmoon P., Gilder A.S., Gonias S.L. LDL receptor-related protein-1 regulates NF κ B and microRNA-155 in macrophages to control the inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016, Vol. 113, no. 5, pp. 1369-1374.
140. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Rep.*, 2014, Vol. 6, 13. doi: 10.12703/P6-13.
141. Martínez V.G., Moestrup S.K., Holmskov U., Mollenhauer J., Lozano F. The conserved scavenger receptor cysteine-rich superfamily in therapy and diagnosis. *Pharmacol. Rev.*, 2011, Vol. 63, no. 4, pp. 967-1000.

142. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, Vol. 92, no. 6, pp. 1177-1186.
143. McConnell K.W., Fox A.C., Clark A.T., Chang N.Y., Dominguez J.A., Farris A.B., Buchman T.G., Hunt C.R., Coopersmith C.M. The role of heat shock protein 70 in mediating age-dependent mortality in sepsis. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 6, pp. 3718-3725.
144. McEwen B.S., Wingfield J.C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.*, 2003, Vol. 43, no. 1, pp. 2-15.
145. Mehta J.L., Li D. Identification, regulation and function of a novel lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2002, Vol. 39, no. 9, pp. 1429-1435.
146. Milisav I., Poljšak B., Ribarič S. Reduced risk of apoptosis: mechanisms of stress responses. *Apoptosis*, 2017, Vol. 22, no. 2, pp. 265-283.
147. Minihane A.M., Vinoy S., Russell W.R., Baka A., Roche H.M., Tuohy K.M., Teeling J.L., Blaak E.E., Fenech M., Vauzour D., McArdle H.J., Kremer B.H., Sterkman L., Vafeiadou K., Benedetti M.M., Williams C.M., Calder P.C. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br. J. Nutr.*, 2015, Vol. 114, no. 7, pp. 999-1012.
148. Moeller J.B., Nielsen M.J., Reichhardt M.P., Schlosser A., Sorensen G.L., Nielsen O., Tornøe I., Grønlund J., Nielsen M.E., Jørgensen J.S., Jensen O.N., Mollenhauer J., Moestrup S.K., Holmskov U. CD163-L1 is an endocytic macrophage protein strongly regulated by mediators in the inflammatory response. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 5, pp. 2399-2409.
149. Mooberry L.K., Sabnis N.A., Panchoo M., Nagarajan B., Lacko A.G. Targeting the SR-B1 receptor as a gateway for cancer therapy and imaging. *Front. Pharmacol.*, 2016, Vol. 7, 466. doi: 10.3389/fphar.2016.00466.
150. Morawietz H., Duerschmidt N., Niemann B., Galle J., Sawamura T., Holtz J. Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, Vol. 284, no. 4, pp. 961-965.
151. Motoshima T., Miura Y., Wakigami N., Kusada N., Takano T., Inoshita N., Okaneya T., Sugiyama Y., Kamba T., Takeya M., Komohara Y. Phenotypical change of tumor-associated macrophages in metastatic lesions of clear cell renal cell carcinoma. *Med. Mol. Morphol.*, 2018, Vol. 51, no. 1, pp. 57-63.
152. Muresan X.M., Sticozzi C., Belmonte G., Cervellati F., Ferrara F., Lila M.A., Valacchi G. SR-B1 involvement in keratinocytes *in vitro* wound closure. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2018, Vol. 658, pp. 1-6.
153. Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., Fisher E.A., Gilroy D.W., Goerdt S., Gordon S., Hamilton J.A., Ivashkiv L.B., Lawrence T., Locati M., Mantovani A., Martinez F.O., Mege J.L., Mosser D.M., Natoli G., Saeij J.P., Schultze J.L., Shirey K.A., Sica A., Suttles J., Udalova I., van Ginderachter J.A., Vogel S.N., Wynn T.A. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 2014, Vol. 41, no. 1, pp. 14-20.
154. Murthy S., Larson-Casey J.L., Ryan A.J., He C., Kobzik L., Carter A.B. Alternative activation of macrophages and pulmonary fibrosis are modulated by scavenger receptor, macrophage receptor with collagenous structure. *FASEB J.*, 2015, Vol. 29, no. 8, pp. 3527-3536.
155. Nahrendorf M., Swirski F.K. Abandoning M1/M2 for a network model of macrophage function. *Circ. Res.*, 2016, Vol. 119, no. 3, pp. 414-417.
156. Nakamura K., Funakoshi H., Miyamoto K., Tokunaga F., Nakamura T. Molecular cloning and functional characterization of a human Scavenger Receptor with C-Type Lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, Vol. 280, no. 4, pp. 1028-1035.
157. Nellimarla S., Baid K., Loo Y.M., Gale M., Bowdish D.M., Mossman K.L. Class A Scavenger receptor-mediated double-stranded RNA internalization is independent of innate antiviral signaling and does not require phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 8, pp. 3858-3865.
158. Nomata Y., Kume N., Sasai H., Katayama Y., Nakata Y., Okura T., Tanaka K. Weight reduction can decrease circulating soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 levels in overweight middle-aged men. *Metabolism*, 2009, Vol. 58, no. 9, pp. 1209-1214.
159. Ohnishi K., Komohara Y., Fujiwara Y., Takemura K., Lei X., Nakagawa T., Sakashita N., Takeya M. Suppression of TLR4-mediated inflammatory response by macrophage class A scavenger receptor (CD204). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, Vol. 411, no. 3, pp. 516-522.
160. Olson N.C., Sallam R., Doyle M.F., Tracy R.P., Huber S.A., Olson N.C., Sallam R., Doyle M.F., et al. T helper cell polarization in healthy people: implications for cardiovascular disease. *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, 2013, Vol. 6, no. 5, pp. 772-786.
161. Oshima K., Haeger S.M., Hippensteel J.A., Herson P.S., Schmidt E.P. More than a biomarker: the systemic consequences of heparan sulfate fragments released during endothelial surface layer degradation (2017 Grover Conference Series). *Pulm. Circ.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 2045893217745786. doi: 10.1177/2045893217745786.
162. Ott C., Jacobs K., Haucke E., Navarrete Santos A., Grune T., Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.*, 2014, Vol. 2, pp. 411-429.
163. Ozment T.R., Ha T., Breuel K.F., Ford T.R., Ferguson D.A., Kalbfleisch J., Schweitzer J.B., Kelley J.L., Li C., Williams D.L. Scavenger receptor class A plays a central role in mediating mortality and the development of the pro-inflammatory phenotype in polymicrobial sepsis. *PLoS Pathog.*, 2012, Vol. 8, no. 10, e1002967. doi: 10.1371/journal.ppat.1002967.

164. Padilla O., Pujana M.A., López-de la Iglesia A., Gimferrer I., Arman M., Vilà J.M., Places L., Vives J., Estivill X., Lozano F. Cloning of S4D-SRCRB, a new soluble member of the group B scavenger receptor cysteine-rich family (SRCR-SF) mapping to human chromosome 7q11.23. *Immunogenetics*, 2002, Vol. 54, no. 9, pp. 621-634.
165. Pandey M.S., Baggenstoss B.A., Washburn J., Harris E.N., Weigel P.H. The hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) activates NF- κ B-mediated gene expression in response to 40-400-kDa, but not smaller or larger, hyaluronans. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 20, pp. 14068-14079.
166. Pandey M.S., Miller C.M., Harris E.N., Weigel P.H. Activation of ERK and NF- κ B during HARE-mediated heparin uptake require only one of the four endocytic motifs. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 4, e0154124. doi: 10.1371/journal.pone.0154124.
167. Patten D.A. SCARF1: a multifaceted, yet largely understudied, scavenger receptor. *Inflamm. Res.*, 2018, Vol. 67, no. 8, pp. 627-632.
168. Pearson A.M. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 1996, Vol. 8, pp. 20-28.
169. Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.*, 2008, Vol. 88, no. 4, pp. 1379-1406.
170. Penberthy K.K., Ravichandran K.S. Apoptotic cell recognition receptors and scavenger receptors. *Immunol. Rev.*, 2016, Vol. 269, no. 1, pp. 44-59.
171. Pietzner M., Kaul A., Henning A.K., Kastenmüller G., Artati A., Lerch M.M., Adamski J., Nauck M., Friedrich N. Comprehensive metabolic profiling of chronic low-grade inflammation among generally healthy individuals. *BMC Medicine*, 2017, Vol. 15, no. 1, 210. doi: 10.1186/s12916-017-0974-6.
172. Plüddemann A., Neyen C., Gordon S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods*, 2007, Vol. 43, no. 3, pp. 207-217.
173. Porcheray F., Viaud S., Rimaniol A.C., Léone C., Samah B., Dereuddre-Bosquet N., Dormont D., Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin. Exp. Immunol.*, 2005, Vol. 142, no. 2, pp. 481-489.
174. PrabhuDas M.R., Baldwin C.L., Bollyky P.L., Bowdish D.M.E., Drickamer K., Febbraio M., Herz J., Kobzik L., Krieger M., Loike J., McVicker B., Means T.K., Moestrup S.K., Post S.R., Sawamura T., Silverstein S., Speth R.C., Telfer J.C., Thiele G.M., Wang X.Y., Wright S.D., El Khoury J. A consensus definitive classification of scavenger receptors and their roles in health and disease. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 10, pp. 3775-3789.
175. Pullerits R., Brisslert M., Jonsson I.M., Tarkowski A. Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via beta2 integrin Mac-1. *Arthritis Rheum.*, 2006, Vol. 54, no. 12, pp. 3898-3907.
176. Qian L., Li X., Fang R., Wang Z., Xu Y., Zhang H., Bai H., Yang Q., Zhu X., Ben J., Xu Y., Chen Q. Class A scavenger receptor deficiency augments angiotensin II-induced vascular remodeling. *Biochem. Pharmacol.*, 2014, Vol. 90, no. 3, pp. 254-264.
177. Raggi F., Pelassa S., Pierobon D., Penco F., Gattorno M., Novelli F., Eva A., Varesio L., Giovarelli M., Bosco M.C. Regulation of human macrophage M1-M2 polarization balance by hypoxia and the triggering receptor expressed on myeloid cells-1. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1097. doi: 10.3389/fimmu.2017.01097.
178. Rahman N., Pervin M., Kuramochi M., Karim M.R., Izawa T., Kuwamura M., Yamate J. M1/M2-macrophage polarization-based hepatotoxicity in d-galactosamine-induced acute liver injury in rats. *Toxicol. Pathol.*, 2018, Vol. 46, no. 7, pp. 764-776.
179. Randle P.J., Garland P.B., Hales C.N., Newsholme E.A. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, 1963, Vol. 281, no. 7285, pp. 785-789.
180. Ranoa D.R., Kelley S.L., Tapping R.I. Human lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 14, pp. 9729-9741.
181. Rantakari P., Patten D.A., Valtonen J., Karikoski M., Gerke H., Dawes H., Laurila J., Ohlmeier S., Elima K., Hübscher S.G., Weston C.J., Jalkanen S., Adams D.H., Salmi M., Shetty S. Stabilin-1 expression defines a subset of macrophages that mediate tissue homeostasis and prevent fibrosis in chronic liver injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016, Vol. 113, no. 33, pp. 9298-9303.
182. Rasouli N., Yao-Borengasser A., Varma V., Spencer H.J., McGehee R.E. Jr, Peterson C.A., Mehta J.L., Kern A. Association of scavenger receptors in adipose tissue with insulin resistance in nondiabetic humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2009, Vol. 29, no. 9, pp. 1328-1335.
183. Raymond S.L., Holden D.C., Mira J.C., Stortz J.A., Loftus T.J., Mohr A.M., Moldawer L.L., Moore F.A., Larson S.D., Efron P.A. Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.*, 2017, Vol. 1863, no. 10, Pt. B, pp. 2564-2573.
184. Reaven E., Cortez Y., Leers-Sucheta S., Nomoto A., Azhar S. Dimerization of the scavenger receptor class B type I: formation, function, and localization in diverse cells and tissues. *J. Lipid. Res.*, 2004, Vol. 45, no. 3, pp. 513-528.
185. Reid D.M., Montoya M., Taylor P.R., Borrow P., Gordon S., Brown G.D., Wong S.Y. Expression of the beta-glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, Vol. 76, pp. 86-94.
186. Riehl A., Németh J., Angel P., Hess J. The receptor RAGE: bridging inflammation and cancer. *Cell Commun. Signal.*, 2009, Vol. 7, 12. doi: 10.1186/1478-811X-7-12.

187. Roach J., Glusman G., Rowen L., Kaur A., Purcell M., Smith K., Hood L., Aderem A. The evolution of vertebrate toll-like receptors. *Proc. National Acad. Sci. USA*, 2005, Vol. 102, no. 27, pp. 9577-9582.
188. Rødgaard-Hansen S., Rafique A., Christensen P.A., Maniecki M.B., Sandahl T.D., Nexø E., Møller H.J. A soluble form of the macrophage-related mannose receptor (MR/CD206) is present in human serum and elevated in critical illness. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2014, Vol. 52, no. 3, pp. 453-461.
189. Rohrer L., Freeman M., Kodama T., Penman M., Krieger M. Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature*, 1990, Vol. 343, pp. 570-572.
190. Röszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 816460. doi: 10.1155/2015/816460.
191. Sachet M., Liang Y.Y., Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis*, 2017, Vol. 22, pp. 1189-1204.
192. Sackstein R. Glycoengineering of HCELL, the human bone marrow homing receptor: sweetly programming cell migration. *Ann. Biomed. Eng.*, 2012, Vol. 40, no. 4, pp. 766-776.
193. Saito A., Munakata H. Analysis of plasma proteins that bind to glycosaminoglycans. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, Vol. 1770, no. 2, pp. 241-246.
194. Sarrias M.R., Grønlund J., Padilla O., Madsen J., Holmskov U., Lozano F. The scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 24, no. 1, pp. 1-37.
195. Schaefer D.J., Alayash A.I., Buehler P.W. Gating the radical hemoglobin to macrophages: the anti-inflammatory role of CD163, a scavenger receptor. *Antioxid. Redox Signal.*, 2007, Vol. 9, no. 7, pp. 991-999.
196. Schaffer J.E. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2003, Vol. 14, no. 3, pp. 281-287.
197. Semple J.W., Freedman J. Platelets and innate immunity. *Cell Mol. Life Sci.*, 2010, Vol. 67, no. 4, pp. 499-511.
198. Senbanjo L.T., Chellaiah M.A. CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2017, Vol. 5, 18. doi: 10.3389/fcell.2017.00018.
199. Senn J.J. Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *J. Biol. Chem.*, 2006, Vol. 281, no. 37, pp. 26865-26875.
200. Shevtsov M., Multhoff G. Heat shock protein-peptide and HSP-based immunotherapies for the treatment of cancer. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 171. doi: 10.3389/fimmu.2016.00171.
201. Shibata M., Ishii J., Koizumi H., Shibata N., Dohmae N., Takio K., Adachi H., Tsujimoto M., Arai H. Type F scavenger receptor SREC-I interacts with advillin, a member of the gelsolin/villin family, and induces neurite-like outgrowth. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 38, pp. 40084-40090.
202. Silverstein R.L., Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci. Signal.*, 2009, Vol. 2, no. 72, re3. doi: 10.1126/scisignal.272re3.
203. Sparvero L.J., Asafu-Adjei D., Kang R., Tang D., Amin N., Im J., Rutledge R., Lin B., Amoscato A.A., Zeh H.J., Lotze M.T. RAGE (Receptor for advanced glycation endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J. Transl. Med.*, 2009, Vol. 17, no. 7, 17. doi: 10.1186/1479-5876-7-17.
204. Stambach N.S., Taylor M.E. Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology*, 2003, Vol. 13, no. 5, pp. 401-410.
205. Stephen S.L., Freestone K., Dunn S., Twigg M.W., Homer-Vanniasinkam S., Walker J.H., Wheatcroft S.B., Ponnambalam S. Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease. *Int. J. Hypertens.*, 2010, Vol. 2010, 646929. doi: 10.4061/2010/646929.
206. Stetler R.A., Gan Y., Zhang W., Liou A.K., Gao Y., Cao G., Chen J. Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the CNS. *Prog. Neurobiol.*, 2010, Vol. 92, no. 2, pp. 184-211.
207. Stewart C.R., Stuart L.M., Wilkinson K., van Gils J.M., Deng J., Halle A., Rayner K.J., Boyer L., Zhong R., Frazier W.A., Lacy-Hulbert A., El Khoury J., Golenbock D.T., Moore K.J. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, pp. 155-161.
208. Tabas I., Bornfeldt K.E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis. *Circ. Res.*, 2016, Vol. 118, no. 4, pp. 653-667.
209. Tang D., Kang R., Coyne C.B., Zeh H.J., Lotze M.T. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.*, 2012, Vol. 249, no. 1, pp. 158-175.
210. Tashima Y., Okajima T. Congenital diseases caused by defective O-glycosylation of Notch receptors. *Nagoya J. Med. Sci.*, 2018, Vol. 80, no. 3, pp. 299-307.
211. Terpstra V., van Amersfoort E.S., van Velzen A.G., Kuiper J., van Berkel T.J. Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000, Vol. 20, no. 8, pp. 1860-1872.
212. Terpstra V., van Berkel T.J. Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the *in vivo* uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice. *Blood*, 2000, Vol. 95, no. 6, pp. 2157-2163.
213. Tisi D., Talts J.F., Timpl R., Hohenester E. Structure of the C-terminal laminin G-like domain pair of the laminin alpha2 chain harbouring binding sites for alpha-dystroglycan and heparin. *EMBO J.*, 2000, Vol. 19, no. 7, pp. 1432-1440.
214. Todt J.C., Hu B., Curtis J.L. The scavenger receptor SR-A I/II (CD204) signals via the receptor tyrosine kinase Mertk during apoptotic cell uptake by murine macrophages. *J. Leukoc.*, 2008, Vol. 84, no. 2, pp. 510-518.

215. Toole B.P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev. Cancer*, 2004, Vol. 4, no. 7, pp. 528-539.
216. Tsai S., Clemente-Casares X., Revelo X.S., Winer S., Winer D.A. Are obesity-related insulin resistance and type 2 diabetes autoimmune diseases? *Diabetes*, 2015, Vol. 64, no. 6, pp. 1886-1897.
217. Tsoni S.V., Brown G.D. Beta-Glucans and dectin-1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, Vol. 1143, pp. 45-60.
218. Tumova J., Andel M., Trnka J. Excess of free fatty acids as a cause of metabolic dysfunction in skeletal muscle. *Physiol. Res.*, 2016, Vol. 65, pp. 193-207.
219. Valenzuela-Sánchez F., Valenzuela-Méndez B., Rodríguez-Gutiérrez J.F., Estella-García Á., González-García M.Á. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. *Ann. Transl. Med.*, 2016, Vol. 4, no. 17, p. 329.
220. van Gorp H., Delputte P.L., Nauwynck H.J. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol. Immunol.*, 2010, Vol. 47, no. 7-8, pp. 1650-1660.
221. van Tits L.J., Stienstra R., van Lent P.L., Netea M.G., Joosten L.A., Stalenhoef A.F. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Krüppel-like factor 2. *Atherosclerosis*, 2011, Vol. 214, no. 2, pp. 345-349.
222. Vasquez M., Simões I., Consuegra-Fernández M., Aranda F., Lozano F., Berraondo P. Exploiting scavenger receptors in cancer immunotherapy: Lessons from CD5 and SR-B1. *Eur. J. Immunol.*, 2017, Vol. 47, no. 7, pp. 1108-1118.
223. Vlassara H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2001, Vol. 17, no. 6, pp. 436-443.
224. Wågsäter D., Olofsson PS, Norgren L, Stenberg B, Sirsjö A. The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon gamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, Vol. 325, no. 4, pp. 1187-1193.
225. Wang J.Y., Lai C.L., Lee C.T., Lin C.Y. Electronegative low-density lipoprotein L5 impairs viability and NGF-induced neuronal differentiation of PC12 cells via LOX-1. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 8, E1744. doi: 10.3390/ijms18081744.
226. Wang Y., Souabni A., Flavell R.A., Wan Y.Y. An intrinsic mechanism predisposes Foxp3-expressing regulatory T cells to Th2 conversion *in vivo*. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 10, pp. 5983-5992.
227. Whelan F.J., Meehan C.J., Golding G.B., McConkey B.J., Bowdish D.M. The evolution of the class A scavenger receptors. *BMC Evol. Biol.*, 2012, Vol. 12, 227. doi: 10.1186/1471-2148-12-227.
228. White J.G. Why human platelets fail to kill bacteria. *Platelets*, 2006, Vol. 17, no. 3, pp. 191-200.
229. Wicker-Planquart C., Bally I., Fracher Ph., Delneste Y., Housset D., Thielens N.M. Scavenger receptors expressed by endothelial cells SREC-I/SR-F1 and SREC-II both interact with C1q and calreticulin. *Molecul. Immunol.*, 2018, Vol. 102, p. 220.
230. Wilkinson K., El Khoury J. Microglial scavenger receptors and their roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.*, 2012, Vol. 2012, 489456. doi: org/10.1155/2012/489456.
231. Wlodarska M., Thaïss C.A., Nowarski R., Henao-Mejia J., Zhang J.P., Brown E.M., Frankel G., Levy M., Katz M.N., Philbrick W.M., Elinav E., Finlay B.B., Flavell R.A. NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell*, 2014, Vol. 156, no. 5, pp. 1045-1059.
232. Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 1980, Vol. 68, pp. 251-306.
233. Xia C., Rao X., Zhong J. Role of T lymphocytes in type 2 diabetes and diabetes-associated inflammation. *J. Diabetes Res.*, 2017, Vol. 2017, 6494795. doi: 10.1155/2017/6494795.
234. Xu Z., Xu L., Li W., Jin X., Song X., Chen X., Zhu J., Zhou S., Li Y., Zhang W., Dong X., Yang X., Liu F., Bai H., Chen Q., Su C. Innate scavenger receptor-A regulates adaptive T helper cell responses to pathogen infection. *Nat. Commun.*, 2017, Vol. 8, 16035. doi: 10.1038/ncomms16035.
235. Yamaguchi T., Takizawa F., Fisher U., Dijkstra J.M. Along the axis between Type 1 and Type 2 immunity; principles conserved in evolution from fish to mammals. *Biology (Basel)*, 2015, Vol. 4, no. 4, pp. 814-859.
236. Yang M., Kholmukhamedov A., Schulte M.L., Cooley B.C., Scoggins N.O., Wood J.P., Cameron S.J., Morrell C.N., Jobe S.M., Silverstein R.L. Platelet CD36 signaling through ERK5 promotes caspase-dependent procoagulant activity and fibrin deposition *in vivo*. *Blood Adv.*, 2018, Vol. 2, no. 21, pp. 2848-2861.
237. Yang S., Vigerust D.J., Shepherd V.L. Interaction of members of the heat shock protein-70 family with the macrophage mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.*, 2013, Vol. 93, no. 4, pp. 529-536.
238. Yang X., Okamura D.M., Lu X., Chen Y., Moorhead J., Varghese Z., Ruan X.Z. CD36 in chronic kidney disease: novel insights and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2017, Vol. 13, no. 12, pp. 769-781.
239. Yi H., Zuo D., Yu X., Hu F., Manjili M.H., Chen Z., Subjeck J.R., Wang X.Y. Suppression of antigen-specific CD4⁺ T cell activation by SRA/CD204 through reducing the immunostimulatory capability of antigen-presenting cell. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2012, Vol. 90, no. 4, pp. 413-426.
240. Yoshida H., Quehenberger O., Kondratenko N., Green S., Steinberg D. Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrophage mannose receptor in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998, Vol. 18, no. 5, pp. 794-802.

241. Yu H., Ha T., Liu L., Wang X., Gao M., Kelley J., Kao R., Williams D., Li C. Scavenger receptor A (SR-A) is required for LPS-induced TLR4 mediated NF- κ B activation in macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, Vol. 1823, no. 7, pp. 1192-1198.
242. Yu X., Guo C., Fisher P.B., Subjeck J.R., Wang X.Y. Scavenger receptors: emerging roles in cancer biology and immunology. *Adv. Cancer Res.*, 2015, Vol. 128, pp. 309-364.
243. Yu X., Yi H., Guo C., Zuo D., Wang Y., Kim H.L., Subjeck J.R., Wang X.Y. Pattern recognition scavenger receptor CD204 attenuates Toll-like receptor 4-induced NF-kappaB activation by directly inhibiting ubiquitination of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6. *J. Biol. Chem.*, 2011, Vol. 286, no. 21, pp. 18795-18806.
244. Yuzefovych L.V., Solodushko V.A., Wilson G.L., Rachek L.I. Protection from palmitate-induced mitochondrial DNA damage prevents from mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and impaired insulin signaling in rat l6 skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 2012, Vol. 153, pp. 92-100.
245. Zani I.A., Stephen S.L., Mughal N.A., Russell D., Homer-Vanniasinkam S., Wheatcroft S.B., Ponnambalam S. Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells*, 2015, Vol. 4, no. 2, pp. 178-201.
246. Zhang H., Zhang W., Sun X., Dang R., Zhou R., Bai H., Ben J., Zhu X., Zhang Y., Yang Q., Xu Y., Chen Q. Class A1 scavenger receptor modulates glioma progression by regulating M2-like tumor-associated macrophage polarization. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 31, pp. 50099-50116.
247. Zhang L. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2010, Vol. 93, pp. 1-17.
248. Zhu H., Fang X., Zhang D., Wu W., Shao M., Wang L., Gu J. Membrane-bound heat shock proteins facilitate the uptake of dying cells and cross-presentation of cellular antigen. *Apoptosis*, 2016, Vol. 21, no. 1, pp. 96-109.
249. Zhu X., Zong G., Zhu L., Jiang Y., Ma K., Zhang H., Zhang Y., Bai H., Yang Q., Ben J., Li X., Xu Y., Chen Q. Deletion of class A scavenger receptor deteriorates obesity-induced insulin resistance in adipose tissue. *Diabetes*, 2014, Vol. 63, no. 2, pp. 562-577.
250. Zmora N., Levy M., Pevsner-Fishcer M., Elinav E. Inflammasomes and intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.*, 2017, Vol. 10, no. 4, pp. 865-883.
251. Zotova N.V., Chereshevnev V.A., Gusev E.Y. Systemic inflammation: methodological approaches to identification of the common pathological process. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 5, e0155138. doi:10.1371/journal.pone.0155138.
252. Zou Q., Wen W., Zhang X.C. Presepsin as a novel sepsis biomarker. *World J. Emerg. Med.*, 2014, Vol. 5, no. 1, pp. 16-19.

Авторы:

Гусев Е.Ю. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Зотова Н.В. — к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Журавлева Ю.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Черешнев В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Gusev E.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Zotova N.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, B. Eltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Zhuravleva Yu.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Chereshevnev V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 04.11.2019

Отправлена на доработку 20.11.2019

Принята к печати 03.12.2019

Received 04.11.2019

Revision received 20.11.2019

Accepted 03.12.2019

СЕМЕЙСТВО ИНТЕРЛЕЙКИНА-36 КАК НОВЫЙ РЕГУЛЯТОР ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА В БАРЬЕРНЫХ ТКАНЯХ

Сенникова С.В.¹, Топтыгина А.П.^{1, 2}

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Резюме. В составе суперсемейства интерлейкина-1 (IL-1) десять лет назад было выделено семейство интерлейкина-36 (IL-36). Данное семейство включает три изоформы IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , обладающие провоспалительной активностью, и рецепторный антагонист — IL-36ra, реализующий противовоспалительную функцию. Все они связываются с одним и тем же рецептором IL-1R6. Провоспалительные изоформы вовлекают в сигналинг также добавочный белок IL-1RAcP, в результате образовавшийся рецепторный гетеродимер проводит сигнал внутрь клетки. IL-36ra, напротив, препятствует образованию гетеродимера и блокирует прохождение сигнала. Цитокины семейства IL-36 и рецепторы к нему экспрессируются в норме на эпителиальных клетках барьерных тканей, таких как респираторный, кишечный тракт и кожа. Как и все цитокины суперсемейства IL-1, IL-36 синтезируются в неактивной форме и требуют активации, но не за счет каспаз, а за счет ферментов нейтрофилов, таких как катепсин G, протеиназа-3 и эластаза, которые постоянно присутствуют в барьерных тканях. В связи с этим IL-36 вовлечен в гомеостаз барьерных тканей. По-видимому, система цитокинов IL-36 появилась в ответ на развившуюся способность некоторых микроорганизмов ускользать от распознавания и активации системы врожденного иммунитета, в частности провоспалительной системы IL-1. Нарушение баланса между провоспалительными и противовоспалительными ветвями легко приводит к воспалению соответствующей ткани. В данном обзоре рассмотрено участие цитокинов семейства IL-36 в гомеостазе барьерных тканей, роль семейства IL-36 в патогенезе бактериальных, вирусных и грибковых заболеваний кожи, атопического дерматита, аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, синдром Шегрена, язвенный колит и болезнь Крона. Наиболее хорошо изучена роль цитокинов семейства IL-36 в иммунопатогенезе псориаза. В настоящем обзоре изложены современные представления об иммунопатогенезе псориаза. Показана особая роль цитокинов семейства IL-36 как в индукции псориазического воспаления, так и в формировании петли положительной обратной связи, поддерживающей и усиливающей иммунный компонент воспаления, что приводит к прогрессированию заболевания. Отдельно обсуждаются современные методы лечения псориаза, в частности возможный перспективный подход к блокаде IL-36 или использование рекомбинантного IL-36ra для лечения псориазических больных. Экспериментальные исследования в этой области на мышах дают основание для оптимизма.

Ключевые слова: интерлейкин-36, псориаз, воспаление, инфекция, кожа, дерматит

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.
Тел.: 8 (495) 452-18-01.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Address for correspondence:

Toptygina Anna P.
G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology
125212, Russian Federation, Moscow,
Admiral Makarov str., 10.
Phone: 7 (495) 452-18-01.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Образец цитирования:

С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина «Семейство интерлейкина-36 как новый регулятор воспалительного ответа в барьерных тканях» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 49–60. doi: 10.15789/1563-0625-IFA-1880
© Сенникова С.В., Топтыгина А.П., 2020

For citation:

S.V. Sennikova, A.P. Toptygina "Interleukin-36 family as a novel regulator of inflammation in the barrier tissues", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 49–60.
doi: 10.15789/1563-0625-IFA-1880
DOI: 10.15789/1563-0625-IFA-1880

INTERLEUKIN-36 FAMILY AS A NOVEL REGULATOR OF INFLAMMATION IN THE BARRIER TISSUES

Sennikova S.V.^a, Toptygina A.P.^{a, b}

^a G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. The interleukin-36 (IL-36) family was discerned in the superfamily of interleukin-1 (IL-1) ten years ago. This family includes three isoforms of IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , which have pro-inflammatory activity and a specific receptor antagonist, IL-36ra, which implements anti-inflammatory function. All of them bind to the same IL-1R6 receptor. The pro-inflammatory isoforms also involve an accessory IL-1RAcP protein into signaling; resulting into conduction of a signal into the cell via the assembling heterodimer receptor. In contrast, IL-36ra inhibits the formation of a heterodimer and blocks the signal transmission. The cytokines of the IL-36 family and appropriate receptors are normally expressed on epithelial cells in barrier tissues such as the respiratory, intestinal tract and skin. Like all cytokines of the IL-1 superfamily, IL-36 is synthesized as inactive form and requires activation, but not due to caspases, but being mediated by neutrophil enzymes, such as cathepsin G, proteinase-3, and elastase, which are constantly present in barrier tissues. In this regard, IL-36 is involved in homeostasis of barrier tissues. Apparently, the IL-36 cytokine system appeared in response to the developing ability of some microorganisms to avoid immune recognition and activation of innate immune response, and, in particular, the IL-1 pro-inflammatory system. An imbalance between the pro- and anti-inflammatory pathways readily causes inflammation in the corresponding tissue. This review discusses participation of cytokines from the IL-36 family in homeostasis of barrier tissues, as well as potential role of the IL-36 family in pathogenesis of bacterial, viral, and fungal skin diseases, atopic dermatitis, autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, ulcerative colitis and Crohn's disease. The role of IL-36 family cytokines in the immunopathogenesis of psoriasis has been well studied. This review is presenting the modern ideas about immune pathogenesis of psoriasis. The special role of cytokines from the IL-36 family was shown both for induction of psoriatic inflammation and evolving a positive feedback loop that supports and enhances the immune component of inflammation, which leads to progression of the disease. Moreover, modern methods of treating psoriasis are discussed, in particular, a possible promising approach to IL-36 blockade, or usage of recombinant IL-36ra for the treatment of psoriatic patients. Experimental studies in this area in mice provide some grounds for optimism.

Keywords: interleukin-36, psoriasis, inflammation, infection, skin, dermatosis

Введение

Интерлейкин-36 (IL-36) первоначально был описан как некие гены, принадлежащие к суперсемейству IL-1 два десятка лет тому назад, которые несколько раз переименовывались и были известны как IL-1F6, IL-1F8, IL-1F9 и IL-1F5 [52]. Около десяти лет тому назад были исследованы их функции и, наконец, стало ясно, что IL-36 — это отдельное семейство цитокинов, входящее в суперсемейство IL-1. Эти четыре изоформы были названы IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ и антагонист рецепторов IL-36 (ra) соответственно [27]. Все цитокины IL-36 кодируются близко друг к другу, у человека на 2-й хромосоме, в кластере, содержащем большинство других цитокинов суперсемейства IL-1 [28]. Все цитокины семейства IL-36 распознаются рецептором IL-36 (IL-1R6). Ранее этот рецептор был известен как Interleukin-1 Receptor-Related Protein 2 (IL-1Rrp2), или Interleukin 1 Receptor Like 2

(IL1RL2) [9]. Его лигандами являются все члены семейства IL-36: IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ и IL-36ra. Кроме того, известно, что IL-38 связывает этот рецептор [73]. Для проведения сигнала необходимо также рекрутирование вспомогательного белка рецептора IL-1 (IL-1RAcP) в качестве корецептора [70]. Для рецепторов семейства IL-1 вообще характерно вовлечение вспомогательных корецепторов, в частности IL-1RAcP также участвует в проведении сигнала от IL-1 α и IL-1 β .

Биологические функции цитокинов семейства IL-36

Изоформы IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ обладают провоспалительной функцией и действуют как агонисты рецептора [70], IL-36ra действует как противовоспалительный медиатор [22]. IL-1R6 в основном обнаруживается в эпителиальных клетках барьерных тканей организма [70]. В норме IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ и IL-36ra преимущественно продуцируются кератиноцитами кожи [10]. Кроме того, IL-36 α и IL-36 γ экспрес-

сируются эпителием дыхательных путей [17], а IL-36 β и IL-36 γ — эпителием кишечника [47]. Экспрессия IL-1R6, IL-36 γ [8] и IL-36 α [20] была выявлена в глиальных клетках мыши, что свидетельствует об участии IL-36 в физиологии мозга. При воспалении и других патологических состояниях клетки иммунной системы, такие как плазматические клетки, Т-клетки, макрофаги и дендритные клетки, продуцируют IL-36 [10, 75].

Все цитокины IL-36 продуцируются и секретируются в неактивной форме, но без сайта расщепления каспазой, что характерно для других представителей суперсемейства IL-1. В отличие от «традиционных» цитокинов IL-1, цитокины IL-36 регулируются независимо от воспаления [71]. Для активации цитокинов IL-36 требуется расщепление различными протеазами. Так, IL-36 α активируется преимущественно катепсином G и эластазой, IL-36 β — катепсином G, IL-36 γ — протеиназой-3 и эластазой, а IL-36 α — эластазой. Такое расщепление приводит к повышению активности изоформ IL-36 в сотни и даже в тысячи раз. Показано, что необходимый для активации IL-36 протеолиз преимущественно осуществляется за счет нейтрофилов, имеющих полный набор активирующих протеаз [71]. Протеазы способны обрабатывать IL-36 либо в виде свободных ферментов, либо в виде NET-связанных протеаз [19].

Сигналинг через рецептор IL-36 начинается со связывания активированного цитокина с IL-1R6 и димеризации последнего с IL-1RAcP, что приводит к фосфорилированию TIR-доменов, входящих в состав обоих рецепторов, а это индуцирует пути внутриклеточного сигналинга (рис. 1) [71]. Фосфорилирование TIR-доменов приводит к вовлечению гена миелоидной дифференцировки 88 (MyD88) [65], а это индуцирует активацию ядерного фактора- κ B (NF- κ B) и активацию митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK), что, в свою очередь, приводит к индукции провоспалительных цитокинов, в том числе IL-12, IL-6, TNF и IL-23 [22, 71]. В кератиноцитах, обработанных IL-36 γ , было обнаружено большое количество активированных генов, включая IL-1 β , IL-36 γ и гены-мишени NF- κ B TNFAIP3, NFKB1A, NFKB2, CXCL8 и BIRC3 [65]. IL-36 α имеет в своей структуре участок, препятствующий связыванию с IL-1RAcP, что блокирует внутриклеточный сигналинг [22, 71]. IL-38 не является членом семейства IL-36, но принадлежит к суперсемейству IL-1 и также может связываться с IL-1R6 и обладает схожими противовоспалительными эффектами с IL-36 α [73]. Установлено, что IL-36 α и IL-38 имеют практически одинаковые воздействия на иммунокомпетентные клетки. Например, оба цитокина IL-36 α

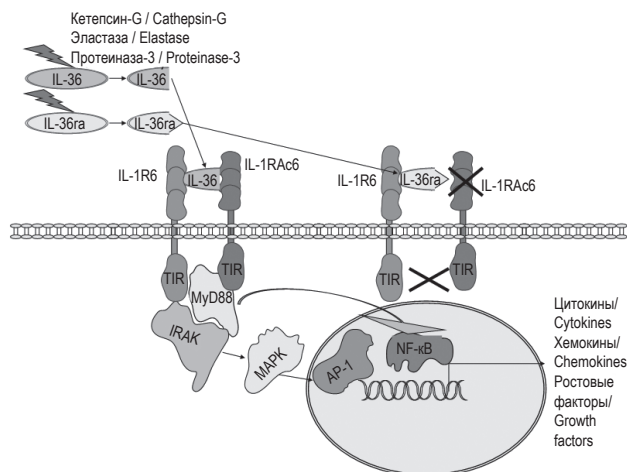


Рисунок 1. Сигнальный путь рецептора цитокинов семейства IL-36

Примечание. На схеме представлена активация цитокинов семейства IL-36, связывание с рецептором IL-1R6 и корецептором IL-1AcP. Связывание с рецептором IL-36 α , β и γ запускает провоспалительный каскад; связывание с рецептором IL-36 α препятствует вовлечению IL-1AcP и оказывает противовоспалительное действие. TIR – Toll/интерлейкин-1 рецептор; MyD88 – белок миелоидной дифференцировки первичного ответа; IRAKs – интерлейкин-1 рецептор-ассоциированная киназа; MAPK – митоген-активированная протеинкиназа; NF- κ B – ядерный фактор κ активированным В-клеткам; AP 1 – активатор протеинов 1.

Figure 1. IL-36 family cytokine receptor signaling pathway
Note. The figure shows the activation of cytokines of the IL-36 family, binding to the IL-1R6 receptor and the IL-1AcP coreceptor. Binding to the IL-36 α , β , and γ receptor triggers a pro-inflammatory cascade; IL-36 α receptor binding inhibits IL-1AcP involvement and has an anti-inflammatory effect. TIR – Toll/interleukin-1 receptor; MyD88 – myeloid differentiation primary response 88; IRAKs – interleukin-1 receptor-associated kinases; MAPK – mitogen activated protein kinases; NF- κ B – nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B cells; AP 1 – activator protein 1.

и IL-38 снижают индуцируемую *Candida* продукцию IL-17 и IL-2 [73], что свидетельствует о том, что не только IL-36 α , но также IL-38 является мощным природным ингибитором провоспалительных цитокинов IL-36.

Суперсемейство IL-1 широко представлено и активно работает во многих клетках организма млекопитающих и их эволюционных предшественников. Считают, что гены семейства IL-36 возникли в результате дупликации генов семейства IL-1, поскольку имеют высокую степень сходства первичной, вторичной и третичной структуры их белковых продуктов [27]. Внутри самого семейства IL-36 также отмечается высокая степень гомологии, составляющая 91% для IL-36 α , 54, 62 и 56% – для IL-36 β , IL-36 γ соответственно [68]. Спрашивается: зачем нужна была еще одна система провоспалительных цитокинов с собственными рецепторами

и регуляторами, если уже и так есть хорошо работающая система IL-1? Наибольшая активность IL-36 выявлена в барьерных тканях организма (коже, легких и кишечнике). Вторым важным аспектом — система IL-36 работает постоянно в режиме гомеостаза. Действие основано на балансе постоянно продуцируемых провоспалительных IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ и противовоспалительного IL-36 α , в отличие от IL-1, который активируется в ответ на реальную атаку микроорганизмов, развивает воспалительный ответ и балансируется своим антагонистом. По-видимому, система цитокинов IL-36 появилась в ответ на развившуюся способность некоторых микроорганизмов ускользать от распознавания и активации системы врожденного иммунитета, в частности провоспалительной системы IL-1. Потребовалась новая, постоянно активная система, а не активирующаяся по случаю. Эта гипотеза подтверждается тем фактом, что цитокины IL-36 широко представлены у многих видов [43]. Действительно, распознавание IL-36 α , IL-36 β и IL-36 γ рецептором IL-1R6 приводит к более высокой антимикробной активности соответствующих клеток. Это включает в себя повышенное созревание/дифференцировку мышиных и человеческих миелоидных клеток [31, 42, 75], повышенный бактериальный клиренс мышиными макрофагами в модели сепсиса [67] и повышенную выработку антимикробных пептидов человеческими кератиноцитами [55]. Кроме того, IL-36 индуцирует в кератиноцитах, клетках Лангерганса и макрофагах продукцию провоспалительных медиаторов, таких как цитокины: фактор некроза опухоли (TNF), IL-6 и IL-8 [25, 44], и хемокины: CXCL1, CXCL2, CXCL8, CCL3, CCL5 и CCL20. Передача сигналов IL-36 приводит к привлечению лейкоцитов в кожу человека [31]. Полагают, что члены семейства IL-36 играют важную роль в связях врожденной и адаптивной иммунной системы. Они не только рекрутируют и активируют клетки врожденной иммунной системы, но также оказывают косвенное и прямое влияние на пролиферацию и пластичность адаптивных иммунных клеток. Было показано, что передача сигналов IL-36 способствует пролиферации Т-клеток [31]. Кроме того, это помогает поляризовать наивные Т-хелперы в сторону Th1 за счет усиления продукции IL-2 [76]. IL-36 дозозависимо усиливает продукцию интерферона (IFN)- γ , IL-4 и IL-17A *in vitro* и стимулирует формирование Th1-клеток при иммунном ответе *in vivo* [75]. Было показано, что такие цитокины, как TNF, IL-17A и IL-22, напрямую усиливают продукцию цитокинов IL-36, а те, в свою очередь, индуцируют продукцию TNF, IL-6 и IL-8 в культуре кератиноцитов человека [13].

Роль цитокинов семейства IL-36 в воспалительных заболеваниях кожи

Как и большинство барьерных тканей, кожа колонизируется бактериями, вирусами, грибами, а иммунные клетки должны различать комменсалы и потенциально патогенные микроорганизмы [62]. Так, золотистый стафилококк (*S. aureus*), грамположительные кокки колонизируют кожу примерно у 10-20% здоровой популяции людей как часть нормальной флоры [46]. Значительная доля всех инфекций кожи и мягких тканей у стационарных больных вызвана инфекцией *S. aureus* [50]. IL-36 α преимущественно продуцируется при поверхностном бактериальном воздействии, тогда как IL-1 β активируется после бактериальных стимулов в более глубоких слоях кожи [45]. Показано, что феноластворимый модулин α — основной фактор вирулентности *S. aureus* — приводит к индукции IL-36 α в кератиноцитах. Кроме того, IL-36 α индуцирует опосредованный IL-17 Т-клеточный ответ, способствующий воспалению кожи [53]. Грибковое поражение кожи может встречаться как самостоятельное заболевание или как суперинфекция, например при atopическом дерматите или псориазе. Работ о роли IL-36 в противогрибковой защите достаточно мало, однако была показана выраженная продукция IL-36 γ при стимуляции кандидализином *in vivo* [74]. Более того, оказалось, что грибки *Candida albicans* и *Trichophyton mentagrophytes* способны индуцировать продукцию IL-36 γ в коже у больных псориазом. Мало того, что существует гистоморфологическое сходство псориаза и некоторых грибковых инфекций, воспаление псориазической кожи может быть вызвано грибами как триггерами процесса. С другой стороны, клиническая картина псориаза может быть вызвана ошибочно направленной реакцией IL-36 γ , которая первоначально была направлена против грибковых инфекций [11]. Цитокины семейства IL-36 вовлечены также и в противовирусную защиту. В кератиноцитах человека стимуляция *in vitro* вирусом простого герпеса (HSV-1) приводила к индукции IL-36 α , но не индукции IL-36 β и IL-36 γ [48]. Напротив, повышенные уровни IL-36 γ были обнаружены в вагинальных эпителиальных клетках после инфекции HSV-2 [36]. Было обнаружено, что экзогенный IL-36 γ способен ингибировать вирусную репликацию. Обработка IL-36 γ приводила к выработке провоспалительных цитокинов, антимикробных пептидов и хемокинов (например, CCL20) [36].

Серьезную проблему на сегодняшний день представляет такая патология кожи, как atopический дерматит. Было показано увеличение экспрессии IL-36 α , IL-36 γ и IL-36 α в пораженной коже пациентов по сравнению с неповрежден-

ной кожей [63]. Выявлено значимое повышение IL-36 α у пациентов с буллезным пемфигоидом, вульгарным пемфигусом и герпетиформным дерматитом, положительно коррелировавшее с уровнем IL-17 [79].

Постепенно в научной среде формируется ответ на еще один принципиальный вопрос: зачем нужны были 3 изоформы IL-36, если они все равно связываются с одним и тем же рецептором и весь внутриклеточный сигналинг далее идет одинаково? Как уже было обсуждено выше, изоформы IL-36 по-разному экспрессируются в различных барьерных тканях [8, 10, 17, 47] в гомеостатических условиях, и разные изоформы активируются на различные стимулы при патологии [36, 45, 48, 53, 74]. Более того, показано, что эпидермальный фактор роста (EGF) участвует в регуляции IL-36 α и IL-36 β в коже [32], транскрипционный фактор T-bet регулирует IL-36 γ в миелоидных клетках [6]. Показано, что провоспалительные цитокины TNF, IL-17, IL-22 индуцируют продукцию IL-36 в кератиноцитах, а сам IL-36 также способен усилить собственную продукцию [13, 65]. Агонист TLR7 индуцирует продукцию IL-36, особенно IL-36 γ в кератиноцитах [66], лиганды TLR2 и TLR4, липополисахариды *Porphyromonas gingivalis* (LPS) и LPS *Escherichia coli* приводят к повышенной продукции IL-36 γ , но не IL-36 α и IL-36 β [7], экспрессия IL-36 γ в нормальных эпителиальных клетках бронхов человека увеличивается после стимуляции лигандом TLR3 и IL-17A [51].

Псориаз

Псориаз — хроническое системное воспалительное заболевание, в основе патогенеза которого лежат генетические и иммунологические нарушения, триггером которого могут быть как внешние, так и внутренние факторы [40]. В основе формирования псориазической папулы лежит хроническое воспаление, реализуемое активно пролиферирующими кератиноцитами, а также активированными иммунными клетками [24]. На территории Европы частота встречаемости псориаза колеблется от 0,6 до 6,5%. В США частота случаев заболевания псориазом составляет 3,15%. Реже заболевание встречается в Китае и Японии [14]. В России, по данным за 2016 год, заболеваемость псориазом достигла уровня 65,0 на 100 тысяч населения [5]. Псориаз одинаково часто встречается как у мужчин, так и у женщин.

Принято выделять следующие формы псориаза: вульгарный, пустулезный, артропатический псориаз и псориазическая эритродермия. Наиболее часто встречающимся, до 90% зафиксированных клинических проявлений, является вульгарный псориаз. Выделяют следующие разновидности вульгарного псориаза: каплевидный, себорейный, ладонно-подошвенный, псориаз

складок и бляшечный псориаз. Клинически наиболее тяжело протекает пустулезный псориаз с его вариантами течения (ладонно-подошвенный — тип Барбера; генерализованный — тип Цумбуша), эритродермический и артропатический псориаз [1]. Первичные элементы на кожном покрове преимущественно развиваются в механически напряженных областях, таких как поверхность разгибателя рук и ног, крестцовая область и голова [12]. При вульгарном псориазе обнаруживаются четко ограниченные, эритематозные, зудящие папулезные элементы, обильно покрытые серебристыми чешуйками, способные сливаться в бляшки. Гистологические исследования бляшечной формы псориаза выявляют гиперплазию эпидермиса (акантоз с равномерным удлинением эпидермальных отростков и папилломатоз), гиперпаракератоз, очаговый агранулез с формированием микроабсцессов Мунро [58].

В настоящий момент не вызывает сомнения, что ведущим фактором в развитии псориаза является генетическая предрасположенность. Так, известно, что носители аллеля HLA-C*06:02 имеют предрасположенность к заболеванию псориазом [21]. Носители этого аллеля, а также родственных аллелей HLA-C*07:01, HLA-C*07:02 и HLA-B*27 способны экспрессировать некоторые аутопептиды, закодированные в локусе PSORS1 (psoriasis susceptibility locus 1) на 6-ой хромосоме в положении 6p21.3 [26]. Такое распознавание вовлекает CD8⁺ лимфоциты в аутоиммунный процесс. Однако для запуска воспалительного процесса недостаточно только генетической предрасположенности, необходимы средовые факторы. К триггерным экзогенным факторам относят травму, стрептококковую инфекцию лимфоглоточного кольца, психоневрологический стресс, употребление никотина, злоупотребление алкоголем, прием ряда лекарственных препаратов (β -адреноблокаторы, аминохинолины и др.) [12].

На начальном этапе развития заболевания, в результате гибели кератиноцитов из-за тех или иных триггерных причин, кератиноциты выделяют антимикробные пептиды, такие как β -дефензины и S100 белки и активный пептид кателицидина LL37. Пептид LL37 способен связывать как чужеродную свободную ДНК, так и собственную ДНК, выделяющуюся из гибнущих кератиноцитов. Такой комплекс активирует TLR9 на плазматоцитоподобных дендритных клетках (pDC), что приводит к продукции интерферонов 1-го типа (IFN α и IFN β). Комплекс LL37/ПНК способен активировать pDC через TLR7, а миелоидные DC — через TLR8. Стимуляция TLR и IFN α/β индуцирует созревание миелоидных DC и миграцию их в региональные лим-

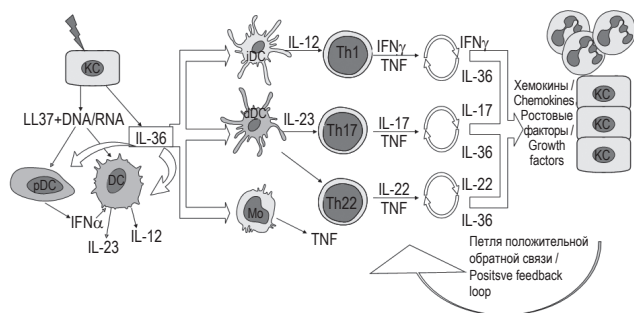


Рисунок 2. Современные представления об иммунопатогенезе псориаза

Примечание. Поврежденные триггерными факторами кератиноциты (KC) выделяют антимикробные пептиды и активный пептид кателицидина LL37, который, связываясь с ДНК и РНК из гибнущих клеток, индуцирует продукцию интерферонов (IFN) 1-го типа плазматическими дендритными клетками (pDC) и интерлейкинов (IL) 12 и 23 созревающими миелоидными дендритными клетками (DC). Сформированные воспалительные дендритные клетки (iDC) и дермальные дендритные клетки (dDC), а также активированные моноциты/макрофаги (Mo) продуцируют провоспалительные цитокины, способствующие дифференцировке Т-хелперов (Th) в сторону Th1, Th17 и Th22, а их цитокины, воздействуя на кератиноциты и другие структурные элементы кожи, способствуют выработке хемокинов, ростовых факторов и антимикробных пептидов, которые приводят к пролиферации и замедлению дифференцировки кератиноцитов. Формируется петля положительной обратной связи, поддерживающая воспалительный процесс. Синтез цитокинов семейства IL-36 индуцируется цитокиновым окружением в воспаленной коже, но и IL-36 поддерживает синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, формируя новые петли положительной обратной связи.

Figure 2. Current views on the immunopathogenesis of psoriasis

Note. Keratinocytes (KC) damaged by trigger factors secrete antimicrobial peptides and the active peptide of cathelicidin LL37, which, by binding to DNA and RNA from dying cells, induces the production of type 1 interferons (IFN) by plasmacytoid dendritic cells (pDC) and interleukins (IL) 12 and 23 by maturing myeloid dendritic cells (DC). Formed inflammatory dendritic cells (iDC) and dermal dendritic cells (dDC), as well as activated monocytes/macrophages (Mo) produce pro-inflammatory cytokines that differentiate T helper cells (Th) towards Th1, Th17 and Th22, and their cytokines, acting on keratinocytes and other structural elements of the skin, contribute to the production of chemokines, growth factors and antimicrobial peptides, which lead to proliferation and slowdown of differentiation of keratinocytes. A positive feedback loop is formed that supports the inflammatory process. The synthesis of cytokines of the IL-36 family is induced by the cytokine environment in the inflamed skin, but IL-36 also supports the synthesis of pro-inflammatory cytokines and chemokines, forming new positive feedback loops.

фоузлы [4], что, в свою очередь, индуцирует активацию Т-клеток и продукцию цитокинов, задействованных в патогенезе псориаза [35, 39]. Созревшие субпопуляции DC, такие как воспалительные DC и дермальные DC, продуцируют цитокины IL-12 и IL-23, которые способствуют дифференцировке Т-хелперов в Th1, Th17 и Th22 (рис. 2). Эти субпопуляции Т-клеток продуцируют IFN γ , IL-17 и IL-22, которые являются основными игроками в патогенезе псориаза [24, 78]. Субпопуляции CD8⁺Т-клеток, такие как Tc1, Tc17 и Tc22, также вовлечены в продукцию этих цитокинов. Кератиноциты в ответ на указанные цитокины повышают продукцию антимикробных пептидов, кателицидина, хемокинов и ростовых факторов. Такое цитокиновое окружение привлекает в очаг воспаления новые иммунокомпетентные клетки, в частности нейтрофилы и миелоидные DC, способствует активной пролиферации кератиноцитов и тормозит их созревание. Это приводит к формированию патогномоничных признаков для псориазической бляшки (акантоз, гиперкератоз и т.п.) и формирует петлю обратной положительной связи, которая усиливает процесс воспаления в пораженной коже. Продукция такого провоспалительного цитокина, как TNF, также повышена за счет активированных моноцитов и Th1, что усиливает воспалительный процесс (рис. 2) [15, 41]. С другой стороны, при псориазе нарушено регуляторное звено иммунитета. Так, например, выявлена дисфункция Treg-клеток при псориазе [64]. Недавние исследования показали, что programmed death (PD-1) молекула вовлечена в патогенез хронического воспаления при псориазе [37].

IL-36 в патогенезе псориаза

Одна из тяжелейших форм псориаза — генерализованный пустулезный псориаз — оказалась при ближайшем рассмотрении первичным иммунодефицитом. Заболевание основано на миссенс-мутации в гене, кодирующем IL-36ra. Дефект IL-36ra (DITRA) приводит к продукции биохимически нестабильного белка, а также к нарушенной рецепторной активности [30]. Анализ экспрессии генов при псориазе выявил активацию всех членов семейства IL-36 [44], но особенно IL-36 α и IL-36 γ [10]. Интересно, что изоформа IL-36 γ , по-видимому, играет специфическую роль при псориазе [23]. Экспрессия IL-36 γ коррелирует с активностью заболевания и снижается во время лечения анти-TNF препаратами, что улучшает состояние больного [23], поэтому полагают, что IL-36 является потенциальным биомаркером для идентификации псориаза и мониторинга течения заболевания. Традиционно считалось, что кератиноциты являются основными модуляторами псориаза.

Однако было обнаружено, что опосредованная Т-клетками иммунная реакция через ось IL-17/IL-23/IL-22 способствует воспалению кожи при псориазе [23]. Согласно современным взглядам, цитокины IL-36 регулируются осью IL-17/IL-23 при псориазе [13], но и сами цитокины IL-17/IL-23 и их биологическое действие индуцируются IL-36 [53] (рис. 2). Таким образом, формируется дополнительная петля положительной обратной связи, которая раскручивает и усиливает биологические эффекты, характерные для псориаза: повышенная пролиферация и замедление дифференцировки кератиноцитов, что способствует развитию гистологического признака псориаза — утолщению эпидермиса [59]. Кроме того, оказалось, что обработка экзогенным IL-36γ приводит к снижению экспрессии маркеров дифференцировки на кератиноцитах. Показано, что сигнальный путь Wnt ответственен за каскад изменений дифференцировки и усиления воспаления кератиноцитов при псориазе [77].

Основной целью в терапии псориаза является снижение клинических проявлений, эпизодов обострения, нормализация качества жизни пациента и уменьшение возможности развития коморбидных состояний [57]. Основными направлениями в лечении псориаза являются местная, системная терапия и фототерапия. При легких формах заболевания предпочтительно использование топических препаратов по комбинированной и ротационной схеме [29]. Топические глюкокортикоидные препараты при воздействии на псориатическую кожу оказывают противовоспалительное и иммуномодулирующее действие. Происходит снижение образования медиаторов воспаления. В свою очередь при длительной терапии и нарушении протокола лечения могут возникать побочные эффекты, такие как атрофия кожи, гипертрихоз, телеангиэктазии, стероидные акне и угнетение функции надпочечников [3]. Глюкокортикоиды в сочетании с салициловой кислотой и производными витамина D3, такие как кальцитриол и бетаметазон дипропионат, считаются наиболее эффективными при лечении псориаза [54]. Принцип действия основан на кератопластическом эффекте витамина D3, характеризующемся снижением пролиферации кератиноцитов и модуляцией эпидермальной дифференцировки, а также иммуномодулирующим эффектом, в частности уменьшением экспрессии IL-2 и IFNγ [49]. Недавние исследования показывают, что эти агенты влияют на петлю обратной связи между IL-36α или IL-36γ и осью IL-23/IL-17 [38]. При более тяжелых формах псориаза терапия нацелена на основные провоспалительные цитокины, такие как IL-1 или TNF [72], а также IFNγ, IL-17 и IL-22. Подавление оси

IL-17/IL-23/IL-22 считается одним из наиболее перспективных направлений в иммунотерапии псориаза [56]. Однако системное введение антицитокиновых биопрепаратов может иметь серьезные побочные эффекты, поэтому все больше внимания уделяется местному введению препаратов. На мышинных моделях показано, что как специфические антитела против мышинного и человеческого IL-1R6, так и антагонисты рекомбинантного происхождения приводят к снижению воспалительного ответа [2, 34]. Эти результаты были подтверждены *in vitro* путем определения снижения продукции IL-17 кератиноцитами и *in vivo* путем определения уменьшения утолщения пораженной псориазом кожи ушей мыши.

Участие IL-36 в патогенезе аутоиммунных заболеваний

Различные изоформы IL-36, помимо псориаза, оказались вовлечены в патогенез аутоиммунных заболеваний различных эпителиальных тканей. Так, было показано, что при ревматоидном артрите повышается продукция IL-36α, IL-36β и IL-36γ клетками синовиальной оболочки пораженных суставов [10]. При системной красной волчанке отмечается значимое повышение IL-36α и IL-36γ в плазме крови, положительно коррелирующее с уровнем IL-10 и активностью заболевания [16]. У пациентов с синдромом Шегрена уровень IL-36α был значимо повышен как в крови, так и в слюнных железах и коррелировал с уровнем IL-17 и IL-22 в сыворотке крови [18]. При воспалительных заболеваниях легких обнаружено повышение IL-36α и IL-36β, сопровождающееся нейтрофильной инфильтрацией легких [60]. Уровень IL-36α и IL-36γ оказался значимо повышен в слизистой пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, особенно при язвенном колите [61]. В мышинной модели остроты воспаления кишечника коррелировала с уровнем IL-36, а блокада его рецептора, напротив, приводила к разрешению воспаления кишечника. У пациентов с болезнью Крона IL-36γ индуцировал продукцию TNF и поддерживал петлю положительной обратной связи за счет продукции IL-17 и аутостимуляции [33].

Заключение

Из приведенных результатов исследований становится понятно, что цитокины семейства IL-36 активно участвуют как в гомеостазе барьерных тканей, так и в регуляции процессов воспаления при защите организма от вторжения чужеродных микроорганизмов. Система цитокинов IL-36 принимает активное участие в защите от бактериальных, вирусных и грибковых поражений кожи и других барьерных тканей. С другой стороны, IL-36 является активным игроком

в патогенезе патологических состояний при аллергических и аутоиммунных заболеваниях барьерных тканей и, за счет формирования петли положительной обратной связи с другими провоспалительными цитокинами, поддерживает активность процесса. В то же время есть основания думать, что блокада рецептора IL-36 или использование рекомбинантного IL-36ra могут оказаться эффективными средствами в лечении

такой патологии. Имеющиеся положительные результаты терапии различных заболеваний путем блокады активности IL-36 в модельных экспериментах на мышах позволяют надеяться, что работы по созданию таких препаратов для людей смогут внести существенный прогресс в терапию тяжелых иммунозависимых воспалительных заболеваний барьерных тканей.

Список литературы / References

1. Дерматовенерология. Национальное руководство. Краткое издание. Под ред. Ю.С. Бутова, Ю.К. Скрипкиной, О.Л. Ивановой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 896 с. [Dermatovenerology. National manual. Brief Edition. Ed. Yu.S. Butov, Yu.K. Skripkina, O.L. Ivanova]. Moscow: GEOTAR-Media, 2013. 896 p.
2. Колобов А.А., Кондратьева Е.В., Кудлинг Т.В., Карасев М.М., Калинин Р.С., Протасов Е.А., Нимирицкий П.П., Стефанов В.Е., Александров Г.В., Петров А.В., Симбирцев А.С. Разработка препарата для лечения псориаза на основе рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина-36 (IL-36ra) человека // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19 (Спец. вып.). С. 271. [Kolobov A.A., Kondratieva E.V., Kudling T.V., Karasev M.M., Kalinin R.S., Protasov E.A., Nimiritsky P.P., Stefanov V.E., Aleksandrov G.V., Petrov A.V., Simbirtsev A.S. Development of a drug for the treatment of psoriasis based on the recombinant human interleukin-36 receptor antagonist (IL-36ra). *Meditsinskaya Immunologiya = Medical immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, Special Iss., p. 271. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-0.
3. Олисова О.Ю., Теплюк Н.П., Пинегин В.Б. Современные методы лечения псориаза // Русский медицинский журнал, 2015. Т. 23, № 9. С. 483-484. [Olisova O.Yu., Teplyuk N.P., Pinegin V.B. Modern methods of treatment of psoriasis. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2015, Vol. 23, no. 9, pp. 483-484. (In Russ.)]
4. Талаев В.Ю. Механизмы управления миграцией миелоидных дендритных клеток и клеток Лангерганса // Иммунология, 2012. Т. 33, № 2. С. 104-112. [Talaev V.Yu. Mechanisms for controlling the migration of myeloid dendritic cells and Langerhans cells. *Immunologiya = Immunology*, 2012, Vol. 33, no. 2, pp. 104-112. (In Russ.)]
5. Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Деловой экспресс, 2016. 415 с. [Federal clinical guidelines. Dermatovenerology 2015: Diseases of the skin. Sexually transmitted infections. 5th ed., rev. and add.]. Moscow: Business Express, 2016. 415 p.
6. Bachmann M., Scheiermann P., Härdle L., Pfeilschifter J., Mühl H. IL-36 γ /IL-1F9, an innate T-bet target in myeloid cells. *J. Biol. Chem.*, 2012, Vol. 287, pp. 41684-41696.
7. Barksby H.E., Nile C.J., Jaedicke K.M., Taylor J.J., Preshaw P.M. Differential expression of immunoregulatory genes in monocytes in response to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Clin. Exp. Immunol.*, 2009, Vol. 156, no. 3, pp. 479-487.
8. Berglöf E., Andre R., Renshaw B.R., Allan S.M., Lawrence C.B., Rothwell N.J., Pinteaux E. IL-1Rrp2 expression and IL-1F9 (IL-1H1) actions in brain cells. *J. Neuroimmunol.*, 2003, Vol. 139, no. 1-2, pp. 36-43.
9. Boraschi D., Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. *Semin. Immunol.*, 2013, Vol. 25, no. 6, pp. 394-407.
10. Boutet M.A., Bart G., Penhoat M., Amiaud J., Brulin B., Charrier C., Morel F., Lecon J.C., Rolli-Derkinderen M., Bourreille A., Vigne S., Gabay C., Palmer G., le Goff B., Blanchard F. Distinct expression of interleukin (IL)-36 α , β and γ , their antagonist IL-36Ra and IL-38 in psoriasis, rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 2016, Vol. 184, no. 2, pp. 159-173.
11. Braegelman J., Braegelman C., Bieber T., Wenzel J. Candida induces the expression of IL-36 γ in human keratinocytes: implications for a pathogendriven exacerbation of psoriasis? *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2018, Vol. 32, no. 11, pp. e403-e406.
12. Bronckers I.M., Paller A.S., van Geel M.J., van de Kerkhof P.C., Seyger M.M. Psoriasis in children and adolescents: diagnosis, management and comorbidities. *Paediatr Drugs.*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 373-384.
13. Carrier Y., Ma H.L., Ramon H.E., Napierata L., Small C., O'Toole M., Young D.A., Fouser L.A., Nickerson-Nutter C., Collins M., Dunussi-Joannopoulos K., Medley Q.G. Inter-regulation of Th17 cytokines and the IL-36 cytokines *in vitro* and *in vivo*: Implications in psoriasis pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, 2011, Vol. 131, no. 12, pp. 2428-2437.
14. Chandran V., Raychaudhuri S.P. Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. *Autoimmun J.*, 2010, Vol. 34, no. 3, pp. 314-321.

15. Chiricozzi A., Guttman-Yassky E., Suárez-Fariñas M., Nogales K.E., Tian S., Cardinale I., Chimenti S., Krueger J.G. Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 2011, Vol. 131, no. 3, pp. 677-687.
16. Chu M., Wong C.K., Cai Z., Dong J., Jiao D., Kam N.W., Lam C.W., Tam L.S. Elevated expression and pro-inflammatory activity of IL-36 in patients with systemic lupus erythematosus. *Molecules*, 2015, Vol. 20, no. 10, pp. 19588-19604.
17. Chustz R.T., Nagarkar D.R., Poposki J.A., Favoreto S., Avila P.C., Schleimer R.P., Kato A. Regulation and function of the IL-1 family cytokine IL-1F9 in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2011, Vol. 45, no. 1, pp. 145-153.
18. Ciccia F., Accardo-Palumbo A., Alessandro R., Alessandri C., Priori R., Guggino G., Raimondo S., Carubbi F., Valesini G., Giacomelli R., Rizzo A., Triolo G. Interleukin-36alpha axis is modulated in patients with primary sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.*, 2015, Vol. 181, no. 2, pp. 230-238.
19. Clancy D.M., Henry C.M., Sullivan G.P., Martin S.J. Neutrophil extracellular traps can serve as platforms for processing and activation of IL-1 family cytokines. *FEBS J.*, 2017, Vol. 284, no. 11, pp. 1712-1725.
20. Costelloe C., Watson M., Murphy A., McQuillan K., Loscher C., Armstrong M.E., Garlanda C., Mantovani A., O'Neill L.A., Mills K.H., Lynch M.A. IL-1F5 mediates anti-inflammatory activity in the brain through induction of IL-4 following interaction with SIGIRR/TIR8. *J. Neurochem.*, 2008, Vol. 105, no. 5, pp. 1960-1969.
21. de Bakker P.I., Raychaudhuri S. Interrogating the major histocompatibility complex with high-throughput genomics. *Hum. Mol. Genet.*, 2012, Vol. 21, pp. R29-R36.
22. Debets R., Timans J.C., Homey B., Zurawski S., Sana T.R., Lo S., Wagner J., Edwards G., Clifford T., Menon S., Bazar J.F., Kastelein R.A. Two novel IL-1 family members, IL-1 delta and IL-1 epsilon, function as an antagonist and agonist of NF-kappa B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 3, pp. 1440-1446.
23. d'Erme A.M., Wilschmann-Theis D., Wagenpfeil J., Hölzel M., Ferring-Schmitt S., Sternberg S., Wittmann M., Peters B., Bosio A., Bieber T., Wenzel J. IL-36 γ (IL-1F9) is a biomarker for psoriasis skin lesions. *J. Invest. Dermatol.*, 2015, Vol. 135, no. 4, pp. 1025-1032.
24. di Cesare A., di Meglio P., Nestle F.O. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 2009, Vol. 129, no. 6, pp. 1339-1350.
25. Dietrich D., Martin P., Flacher V., Sun Y., Jarrossay D., Brembilla N., Mueller C., Arnett H.A., Palmer G., Towne J., Gabay C. Interleukin-36 potentially stimulates human M2 macrophages, Langerhans cells and keratinocytes to produce pro-inflammatory cytokines. *Cytokine*, 2016, Vol. 84, pp. 88-98.
26. di Marco M., Schuster H., Backert L., Ghosh M., Rammensee H.G., Stevanovic S. Unveiling the peptide motifs of HLA-C and HLA-G from naturally presented peptides and generation of binding prediction matrices. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 199, no. 8, pp. 2639-2651.
27. Dinarello C., Arend W., Sims J., Smith D., Blumberg H., O'Neill L., Goldbach-Mansky R., Pizarro T., Hoffman H., Bufler P., Nold M., Ghezzi P., Mantovani A., Garlanda C., Boraschi D., Rubartelli A., Netea M., van der Meer J., Joosten L., Mandrup-Poulsen T., Donath M., Lewis E., Pfeilschifter J., Martin M., Kracht M., Muehl H., Novick D., Lukic M., Conti B., Solinger A., Kelk P., van de Veerdonk F., Gabel C. IL-1 family nomenclature. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 11, p. 973.
28. Dunn E., Sims J.E., Nicklin M.J., O'Neill L.A. Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family. *Trends Immunol.*, 2001, Vol. 22, no. 10, pp. 533-536.
29. European S3-Guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris. Update 2015. EDF in cooperation with EADV and IPC [Accessed on 1 Aug 2017]. Available at: <http://www.euroderm.org/edf/index.php/edf-guidelines/category/5-guidelinesmiscellaneous>.
30. Farooq M., Nakai H., Fujimoto A., Fujikawa H., Matsuyama A., Kariya N., Aizawa A., Fujiwara H., Ito M., Shimomura Y. Mutation analysis of the IL36RN gene in 14 Japanese patients with generalized pustular psoriasis. *Hum. Mutat.*, 2013, Vol. 34, no. 1, pp. 176-183.
31. Foster A.M., Baliwag J., Chen C.S., Guzman A.M., Stoll S.W., Gudjonsson J.E., Ward N.L., Johnston A. IL-36 promotes myeloid cell infiltration, activation, and inflammatory activity in skin. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 12, pp. 6053-6061.
32. Franzke C.-W., Cobzaru C., Triantafyllopoulou A., Löffek S., Horiuchi K., Threadgill D.W., Kurz T., van Rooijen N., Bruckner-Tuderman L., Blobek C.P. Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation. *J. Exp. Med.*, 2012, Vol. 209, no. 6, pp. 1105-1119.
33. Friedrich M., Tillack C., Wollenberg A., Schaubert J., Brand S. IL-36gamma sustains a proinflammatory self-amplifying loop with IL-17c in anti-TNF-induced psoriasiform skin lesions of patients with crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2014, Vol. 20, no. 11, pp. 1891-1901.
34. Ganesan R., Raymond E.L., Mennerich D., Woska J.R., Caviness G., Grimaldi C., Ahlberg J., Perez R., Roberts S., Yang D., Jerath K., Truncali K., Frego L., Sepulveda E., Gupta P., Brown S.E., Howell M.D., Canada K.A.,

Kroe-Barrett R., Fine J.S., Singh S., Mbow M.L. Generation and functional characterization of anti-human and anti-mouse IL-36R antagonist monoclonal antibodies. *MAbs*, 2017, Vol. 9, no. 7, pp. 1143-1154.

35. Ganguly D., Chamilos G., Lande R., Gregorio J., Meller S., Facchinetti V., Homey B., Barrat F.J., Zal T., Gilliet M. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 9, pp. 1983-1994.

36. Gardner J.K., Herbst-Kralovetz M.M. IL-36 γ induces a transient HSV-2 resistant environment that protects against genital disease and pathogenesis. *Cytokine*, 2018, Vol. 111, pp. 63-71.

37. Geller S., Pulitzer M., Horwitz S.M., Moskowicz A.J., Myskowski P.L. Mycosis fungoides, psoriasis and anti-PD-1 – a new aspect of known associations. *J. Dtsch Dermatol. Ges.*, 2019, Vol. 17, no. 2, pp. 186-188.

38. Germán B., Wei R., Hener P., Martins C., Ye T., Gottwick C., Yang J., Seneschal J., Boniface K., Li M. Disrupting the IL-36 and IL-23/IL-17 loop underlies the efficacy of calcipotriol and corticosteroid therapy for psoriasis. *JCI Insight*, 2019, Vol. 4, no. 2, 123390. doi: 10.1172/jci.insight.123390.

39. Gilliet M., Lande R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 4, pp. 401-407.

40. Harden J.L., Krueger J.G., Bowcock A.M. The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review. *J. Autoimm.*, 2015, Vol. 64, pp. 66-73.

41. Harper E.G., Guo C., Rizzo H., Lillis J.V., Kurtz S.E., Skorcheva I., Purdy D., Fitch E., Iordanov M., Blauvelt A. Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes *in vitro* and *in vivo*: implications for psoriasis pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, 2009, Vol. 129, no. 9, pp. 2175-2183.

42. Higgins J., Mutamba S., Mahida Y., Barrow P., Foster N. IL-36 α induces maturation of Th1-inducing human MDDC and synergises with IFN- γ to induce high surface expression of CD14 and CD11c. *Hum. Immunol.*, 2015, Vol. 76, no. 4, pp. 245-253.

43. Jensen L.E. Interleukin-36 cytokines may overcome microbial immune evasion strategies that inhibit interleukin-1 family signaling. *Sci. Signal.*, 2017, Vol. 10, no. 492, eaan3589. doi: 10.1126/scisignal.aan3589.

44. Johnston A., Xing X., Guzman A.M., Riblett M., Loyd C.M., Ward N.L., Wohn C., Prens E.P., Wang F., Maier L.E., Kang S., Voorhees J.J., Elder J.T., Gudjonsson J.E. IL-1F5, -F6, -F8, and -F9: a novel IL-1 family signaling system that is active in psoriasis and promotes keratinocyte antimicrobial peptide expression. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, pp. 2613-2622.

45. Liu H., Archer N.K., Dillen C.A., Wang Y., Ashbaugh A.G., Ortines R.V., Kao T., Lee S.K., Cai S.S., Miller R.J., Marchitto M.C., Zhang E., Riggins D.P., Stibitz S., Geha R.S., Miller L.S. *Staphylococcus aureus* epicutaneous exposure drives skin inflammation via IL-36-mediated T cell responses. *Cell Host Microbe*, 2017, Vol. 22, no. 5, pp. 653-666.e5.

46. Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.*, 1998, Vol. 339, no. 8, pp. 520-532.

47. Medina-Contreras O., Harusato A., Nishio H., Flannigan K.L., Ngo V., Leoni G., Neumann P.A., Geem D., Lili L.N., Ramadas R.A., Chassaing B., Gewirtz A.T., Kohlmeier J.E., Parkos C.A., Towne J.E., Nusrat A., Denning T.L. Cutting edge: IL-36 receptor promotes resolution of intestinal damage. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 1, pp. 34-38.

48. Milora K.A., Uppalapati S.R., Sanmiguel J.C., Zou W., Jensen L.E. Interleukin-36 β provides protection against HSV-1 infection, but does not modulate initiation of adaptive immune responses. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, p. 5799.

49. Mora J.R., Iwata M., von Andrian U.H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 9, pp. 685-698.

50. Moran G.J., Krishnadasan A., Gorwitz R.J., Fosheim G.E., McDougal L.K., Carey R.B., Talan D.A., EMERGENCY ID Net Study Group. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N. Engl. J. Med.*, 2006, Vol. 355, no. 7, pp. 666-674.

51. Mori K., Fujisawa T., Kusagaya H., Yamanaka K., Hashimoto D., Enomoto N., Inui N., Nakamura Y., Maekawa M., Suda T. Synergistic proinflammatory responses by IL-17A and tolllike receptor 3 in human airway epithelial cells. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 9, e0139491. doi: 10.1371/journal.pone.0139491.

52. Mulero J.J., Pace A.M., Nelken S.T., Loeb D.B., Correa T.R., Drmanac R., Ford J.F. IL1HY1: A novel interleukin-1 receptor antagonist gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, Vol. 263, no. 3, pp. 702-706.

53. Nakagawa S., Matsumoto M., Katayama Y., Oguma R., Wakabayashi S., Nygaard T., Saijo S., Inohara N., Otto M., Matsue H., Nunez G., Nakamura Y. *Staphylococcus aureus* virulent PSM α peptides induce keratinocyte alarmin release to orchestrate IL-17-dependent skin inflammation. *Cell Host Microbe*, 2017, Vol. 22, no. 5, pp. 667-677.e5.

54. Nast A., Boehncke W.-H., Mrowietz U., Ockenfels H.-M., Philipp S., Reich K., Rosenbach T., Sammain A., Schlaeger M., Sebastian M., Sterry W., Streit V., Augustin M., Erdmann R., Klaus J., Koza J., Muller S., Orzechowski H.D., Rosumeck S., Schmid-Ott G., Weberschock T., Rzany B. Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG); Berufsverband Deutscher Dermatologen (BVDD). S3-guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris (English version). Update. *J. Dtsch Dermatol. Ges.*, 2012, Vol. 10, Suppl. 2, pp. S1-S95.

55. Nguyen T.T., Niyonsaba F., Ushio H., Akiyama T., Kiatsurayanon C., Smithrithee R., Ikeda S., Okumura K., Ogawa H. Interleukin-36 cytokines enhance the production of host defense peptides psoriasin and LL-37 by human keratinocytes through activation of MAPKs and NF- κ B. *J. Dermatol. Sci.*, 2012, Vol. 68, no. 1, pp. 63-66.
56. Nograles K.E., Krueger J.G. Anti-cytokine therapies for psoriasis. *Exp. Cell Res.*, 2011, Vol. 317, no. 9, pp. 1293-1300.
57. Ortonne J., Chimenti S., Luger T., Puig L., Reid F., Trueb R.M. Scalp psoriasis: European consensus on grading and treatment algorithm. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2009, Vol. 23, no. 12, pp. 1435-1444.
58. Perera G.K., di Meglio P., Nestle F.O. Psoriasis. *Annu. Rev. Pathol.*, 2012, Vol. 7, pp. 385-422.
59. Pfaff C.M., Marquardt Y., Fietkau K., Baron J.M., Lüscher B. The psoriasis associated IL-17A induces and cooperates with IL-36 cytokines to control keratinocyte differentiation and function. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 15631. doi: 10.1038/s41598-017-15892-7.
60. Ramadas R.A., Ewart S.L., Medoff B.D., LeVine A.M. Interleukin-1 family member 9 stimulates chemokine production and neutrophil influx in mouse lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2011, Vol. 44, no. 2, pp. 134-145.
61. Russell S.E., Horan R.M., Stefanska A.M., Carey A., Leon G., Aguilera M., Statovci D., Moran T., Fallon P.G., Shanahan F., Brint E.K., Melgar S., Hussey S., Walsh P.T. IL-36 α expression is elevated in ulcerative colitis and promotes colonic inflammation. *Mucosal Immunol.*, 2016, Vol. 9, no. 5, pp. 1193-1204.
62. Segre J.A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, pp. 1150-1158.
63. Suárez-Fariñas M., Ungar B., Correa da Rosa J., Ewald D.A., Rozenblit M., Gonzalez J., Xu H., Zheng X., Peng X., Estrada Y.D., Dillon S.R., Krueger J.G., Guttman-Yassky E. RNA sequencing atopic dermatitis transcriptome profiling provides insights into novel disease mechanisms with potential therapeutic implications. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 135, no. 5, pp. 1218-1227.
64. Sugiyama H., Gyulai R., Toichi E., Garaczi E., Shimada S., Stevens S.R., McCormick T.S., Cooper K.D. Dysfunctional blood and target tissue CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 1, pp. 164-173.
65. Swindell W.R., Beamer M.A., Sarkar M.K., Loftus S., Fullmer J., Xing X., Ward N.L., Tsoi L.C., Kahlenberg M.J., Liang Y., Gudjonsson J.E. RNA-Seq analysis of IL-1B and IL-36 responses in epidermal keratinocytes identifies a shared MyD88-dependent gene signature. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, p. 80.
66. Takaishi M., Satoh T., Akira S., Sano S. Regnase-1, an immunomodulator, limits the IL-36/IL-36R autostimulatory loop in keratinocytes to suppress skin inflammation. *J. Invest. Dermatol.*, 2018, Vol. 138, no. 6, pp. 1439-1442.
67. Tao X., Song Z., Wang C., Luo H., Luo Q., Lin X., Zhang L., Yin Y., Cao J. Interleukin 36 α attenuates sepsis by enhancing antibacterial functions of macrophages. *J. Infect. Dis.*, 2017, Vol. 215, no. 2, pp. 321-332.
68. Taylor S.L., Renshaw B.R., Garka K.E., Smith D.E., Sims J.E. Genomic organization of the interleukin-1 locus. *Genomics*, 2002, Vol. 79, no. 5, pp. 726-733.
69. Tortola L., Rosenwald E., Abel B., Blumberg H., Schäfer M., Coyle A.J., Renauld J.C., Werner S., Kisielow J., Kopf M. Psoriasiform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 11, pp. 3965-3976.
70. Towne J.E., Garka K., Renshaw B.R., Virca G.D., Sims J.E. Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappa B and MAPKs. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 14, pp. 13677-13688.
71. Towne J.E., Renshaw B.R., Douangpanya J., Lipsky B.P., Shen M., Gabel C.A., Sims J.E. Interleukin-36 (IL-36) ligands require processing for full agonist (IL-36 α , IL-36 β , and IL-36 γ) or antagonist (IL-36Ra) activity. *J. Biol. Chem.*, 2011, Vol. 286, no. 49, pp. 42594-42602.
72. Tsai Y.-C., Tsai T.-F. Anti-interleukin and interleukin therapies for psoriasis: current evidence and clinical usefulness. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.*, 2017, Vol. 9, no. 11, pp. 277-294.
73. van de Veerdonk F.L., Stoeckman A.K., Wu G., Boeckermann A.N., Azam T., Netea M.G., Joosten L.A., van der Meer J.W., Hao R., Kalabokis V., Dinarello C.A. IL-38 binds to the IL-36 receptor and has biological effects on immune cells similar to IL-36 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 8, pp. 3001-3005.
74. Verma A.H., Zafar H., Ponde N.O., Hepworth O.W., Sihra D., Aggor F.E., Ainscough J.S., Ho J., Richardson J.P., Coleman B.M., Hube B., Stacey M., McGeachy M.J., Naglik J.R., Gaffen S.L., Moyes D.L. IL-36 and IL-1/IL-17 drive immunity to oral candidiasis via parallel mechanisms. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 201, no. 2, pp. 627-634.
75. Vigne S., Palmer G., Lamacchia C., Martin P., Talabot-Ayer D., Rodriguez E., Ronchi F., Sallusto F., Dinh H., Sims J.E., Garbay C. IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 22, pp. 5813-5823.

76. Vigne S., Palmer G., Martin P., Lamacchia C., Strebel D., Rodriguez E., Olleros M.L., Vesin D., Garcia I., Ronchi F., Sallusto F., Sims J.E., Gabay C. IL-36 signaling amplifies Th1 responses by enhancing proliferation and Th1 polarization of naive CD4⁺ T cells. *Blood*, 2012, Vol. 120, no. 17, pp. 3478-3487.
77. Wang W., Yu X., Wu C., Jin H. IL-36 γ inhibits differentiation and induces inflammation of keratinocyte via Wnt signaling pathway in psoriasis. *Int. J. Med. Sci.*, 2017, Vol. 14, no. 10, pp. 1002-1007.
78. Zaba L.C., Fuentes-Duculan J., Eungdamrong N.J., Abello M.V., Novitskaya I., Pierson K.C., Gonzalez J., Krueger J.G., Lowes M.A. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.*, 2009, Vol. 129, no. 1, pp. 79-88.
79. Zebrowska A., Wozniacka A., Juczynska K., Ociepa K., Waszczykowska E., Szymczak I., Pawliczak R. Correlation between IL36 α and IL17 and activity of the disease in selected autoimmune blistering diseases. *Mediators Inflamm.*, 2017, Vol. 2017, 8980534. doi: 10.1155/2017/8980534.

Авторы:

Сенникова С.В. — аспирант лаборатории цитокинов
ФБУН «Московский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии имени
Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Топтыгина А.П. — д.м.н., ведущий научный сотрудник
лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-
исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Г.Н. Габричевского»
Роспотребнадзора; профессор кафедры иммунологии
биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский
государственный университет имени
М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Authors:

Sennikova S.V., Postgraduate Student, Laboratory of Cytokines,
G.N.Gabrichovsky Research Institute for Epidemiology and
Microbiology, Moscow, Russian Federation

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Leading Research
Associate, Laboratory of Cytokines, G.N.Gabrichovsky
Research Institute for Epidemiology and Microbiology;
Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology,
M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian
Federation

Поступила 25.10.2019
Отправлена на доработку 20.11.2019
Принята к печати 03.12.2019

Received 25.10.2019
Revision received 20.11.2019
Accepted 03.12.2019

МЕХАНИЗМЫ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ И ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ ПЕРЕСАДКАХ РОГОВИЦЫ

Нероев В.В., Балацкая Н.В., Ченцова Е.В., Шамхалова Х.М.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. На сегодняшний день трансплантация роговицы (кератопластика) относится к наиболее частым операциям по пересадкам солидных тканей в мире, и, в отличие от последних, эта форма вмешательства нередко выполняется без применения тканевого типирования и системной иммуносупрессии.

Высокая частота прозрачного приживления роговичного трансплантата (до 90% случаев), при условии отсутствия факторов риска, обусловлена особыми механизмами иммунной привилегии в переднем отрезке глаза (функционально-структурном объединении роговицы и передней камеры (ПК)), реализуемой посредством локальной и системной иммунорегуляции: феномена иммунного отклонения, связанного с ПК глаза (ACAID), компонентов внутренней жидкой среды — водянистой влаги ПК, обладающих иммуносупрессорными свойствами — IL-1ra, TSP-1, TGF- β 2, регуляторных белков системы комплемента, α -MSH (альфа-меланоцит стимулирующего гормона), VIP (вазоактивного интестинального пептида), индоламин 2,3-диоксигеназы (IDO), кальцитонин-ген-связанного пептида (CGRP), соматостатина и др.

Помимо ACAID и компонентов ВПК, вклад в поддержание иммунной привилегии (имеющей чрезвычайно важное значение для успешного исхода кератопластики) вносят и другие механизмы, поддерживаемые, в частности, иммунологически активными мембраноассоциированными молекулами клеток эндотелия роговицы PDL-1 (лигандом программируемой клеточной гибели 1), а также sVEGFR-1, sVEGFR-2, sVEGFR-3, участвующими в поддержании аваскулярности роговичной ткани. Нарушение иммунной привилегии роговицы создает условия для активации распознавания, включения эффекторных механизмов трансплантационного иммунитета и в дальнейшем с большой вероятностью может привести к развитию реакции тканевой несовместимости и помутнению кератотрансплантата.

Отторжение трансплантата может быть локализовано в любом из клеточных слоев роговицы, включая эпителий, строму и эндотелий. Отторжение эндотелия относится к наиболее тяжелой для зрительных функций форме, что обусловлено невозможностью восстановления эндотелиальных клеток роговицы, накоплением в ней воды вследствие нарушения функций эндотелиоцитов. Отторжение трансплантата клинически характеризуется его отеком и наличием воспалительных клеток, как циркулирующих в передней камере, так и в виде преципитатов на эндотелиальных клетках трансплантата.

Адрес для переписки:

Балацкая Наталья Владимировна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр глазных болезней имени Гельмгольца»
Министерства здравоохранения РФ
105062, Россия, Москва,
ул. Садовая-Черногызская, 14/19.
Тел.: 8 (916) 976-61-27.
E-mail: balnat07@rambler.ru

Address for correspondence:

Balatskaya Natalia V.
Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases
105062, Russian Federation, Moscow,
Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19.
Phone: 7 (916) 976-61-27.
E-mail: balnat07@rambler.ru

Образец цитирования:

В.В. Нероев, Н.В. Балацкая, Е.В. Ченцова,
Х.М. Шамхалова «Механизмы иммунорегуляции
и трансплантационный иммунитет при пересадках
роговицы» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22,
№ 1. С. 61-76.
doi: 10.15789/1563-0625-MOI-1768
© Нероев В.В. и соавт., 2020

For citation:

V.V. Neroev, N.V. Balatskaya, E.V. Chentsova,
Kh.M. Shamkhalova "Mechanisms of immune regulation and
transplantation immunity in corneal transplants", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 1, pp. 61-76.
doi: 10.15789/1563-0625-MOI-1768
DOI: 10.15789/1563-0625-MOI-1768

С повышенным риском отторжения трансплантата роговицы ассоциирован ряд факторов, включая: степень воспаления и/или васкуляризации трансплантационного ложа (места размещения донорской роговицы), повторная кератопластика, аллосенсибилизация (вследствие других пересадок солидных органов, в том числе костного мозга, переливания крови, беременности и т. д.), аллергические и системные заболевания.

В настоящем обзоре проанализированы и систематизированы данные литературы, посвященной исследованиям факторов иммунной привилегии роговицы и феномена ACAID, их роли в формировании аллотолерантности при трансплантации роговицы, выделены основные условия, необходимые для запуска реакции тканевой несовместимости, обсуждаются механизмы аллогенного распознавания и эффекторной стадии иммунного ответа, деструкции роговичного аллотрансплантата.

Ключевые слова: роговица, ACAID, аваскулярность, трансплантация, аллоиммунитет, Treg-лимфоциты, толерантность, кератопластика высокого риска, отторжение трансплантата

MECHANISMS OF IMMUNE REGULATION AND TRANSPLANTATION IMMUNITY IN CORNEAL TRANSPLANTS

Neroev V.V., Balatskaya N.V., Chentsova E.V., Shamkhalova Kh.M.

Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Abstract. At the present time, corneal transplantation (keratoplasty) is one of the most frequent modes of solid tissue transplants in the world. Unlike other kinds of transplants, corneal grafting is often performed without tissue typing and systemic immunosuppression.

High frequency of transparent corneal engraftment (up to 90% of cases) in the absence of risk factors is due to special immunoprivileged area in the anterior eye segment (functionally, a structural aggregation of the cornea and anterior chamber, AC) accomplished by local and systemic immunoregulatory mechanisms, i.e., phenomenon of immune deviation associated with anterior chamber of the eye (ACAID), components of the internal liquid medium, a watery moisture with immunosuppressive properties, e.g., IL-1ra, TSP-1, TGF- β 2, regulatory complement proteins, α -MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone), VIP (vasoactive intestinal peptide), indolamine 2,3-dioxygenase (IDO), calcitonin-gene-bound peptide (CGRP), somatostatin, etc.

In addition to ACAID and liquid AC components, a contribution to the maintenance of immune privilege which is extremely important for a successful outcome of keratoplasty, is provided by other mechanisms, in particular, immunologically active membrane-associated molecules of corneal endothelium, i.e., PDL-1 (Programmed death ligand 1), and sVEGFR-1, sVEGFR-2, sVEGFR-3 involved in maintaining avascularity of the corneal tissue. Disturbances of the immune privilege of the cornea promotes activation of immune recognition with switching the effector mechanisms of transplantation immunity, thus leading to subsequent development of the tissue incompatibility reaction and clouding of transplanted cornea.

Graft rejection can be localized in any of the corneal cell layers, including epithelium, stroma, and endothelium. Endothelial rejection causes the most severe affection of visual functions, due to the inability of local endothelial recovery, and water accumulation due to the endothelial dysfunction. Graft rejection is clinically characterized by edema and the presence of inflammatory cells, either circulating in the anterior chamber, or forming precipitates on the graft endothelial cells.

A number of factors are associated with an increased risk of corneal graft rejection, including the degree of inflammation and/or vascularization of the transplant bed i.e., location of the donor cornea, repeated keratoplasty, allosensitization due to other cellular transplants, including bone marrow, blood transfusions, pregnancy, etc., as well as allergic and systemic diseases.

This review article considers and systematizes the data from the literature concerning studies of the factors determining the immune privileged state of cornea, and the ACAID phenomenon, their role in development of allotolerance in corneal transplantation, highlights the main conditions required for triggering the tissue incompatibility reactions, discusses the mechanisms of allogeneic recognition and effector stage of the immune response, destruction of corneal allografts.

Keywords: cornea, ACAID, avascularity, transplantation, alloimmunity, Treg lymphocytes, tolerance, high risk keratoplasty, transplant rejection

Введение

Первая успешная пересадка роговицы (кератопластика) выполнена более 100 лет и на сегодняшний день занимает лидирующие позиции среди проводимых операций по трансплантации солидных тканей во всем мире, является наиболее востребованным хирургическим вмешательством в офтальмологии [26].

Ежегодно в мире выполняется около 100 000 пересадок роговицы, в России — 5000 трансплантаций, из которых на долю проводимых в Москве приходится около 2500 операций в год [1]. Значимый рост числа пересадок роговицы обусловлен рядом факторов [26].

Во-первых, в связи с ростом количества банков донорских тканей в развивающихся странах отмечается увеличение доступности трансплантатов роговицы.

Во-вторых, пересадка всей роговицы (сквозная кератопластика) постепенно замещается трансплантацией ее отдельных слоев (ламеллярная кератопластика), позволяющей значительно сократить частоту отторжения донорского материала, вследствие снижения аллоантигенной нагрузки [4].

Ключевым прогностическим фактором приживления трансплантата остается статус ложа реципиента, в которое размещают трансплантат роговицы. Показано, что 2-летняя выживаемость трансплантата после сквозной кератопластики при наличии невазкуляризованного и невоспаленного ложа реципиента (пациенты группы «низкого риска») составляет около 90% [79].

У пациентов «группы высокого риска» с воспалительной этиологией поражения роговицы и после неоднократных кератопластик вероятность неблагоприятного исхода аллотрансплантации может достигать более 50%, несмотря на максимально возможную локальную и системную иммуносупрессивную терапию [60]. Эти результаты значительно хуже, чем при трансплантации почек, сердца или печени.

Считают, что высокая частота успешного приживления трансплантата роговицы, наблюдаемого у реципиентов с низким риском отторжения не зависит от совместимости по антигенам МНС донора и проведения системной иммуносупрессивной терапии [60].

Однако, несмотря на наличие благоприятных исходов, в ряде случаев отторжение трансплантата роговицы остается ведущей причиной неуспеха пересадки роговицы [21].

Отторжение трансплантата может быть локализовано в любом из клеточных слоев рого-

вицы, включая эпителий, строму и эндотелий. Отторжение эндотелия относится к наиболее тяжелой для зрительных функций форме, что обусловлено невозможностью восстановления эндотелиальных клеток роговицы и развитием ее отека вследствие нарушения функций. Отторжение трансплантата клинически характеризуется его отеком и наличием воспалительных клеток, как циркулирующих в передней камере, так и в виде преципитатов на эндотелиальных клетках трансплантата.

С повышенным риском отторжения трансплантата роговицы ассоциирован ряд факторов, включая: степень воспаления и/или васкуляризации трансплантационного ложа (места размещения донорской роговицы), повторная кератопластика, аллосенсибилизация (вследствие других пересадок солидных органов, в том числе костного мозга, переливания крови, беременности и т. д.), аллергические и системные заболевания [57]. В обзоре А. Amouzeга и соавт. приводятся сводные данные о факторах, ассоциированных с иммунной и ангиогенной привилегией роговицы (табл. 1) [3]. Детально данные факторы будут рассмотрены ниже.

Иммунная привилегия роговицы и ее влияние на трансплантационный иммунитет

Термин «иммунная привилегия» был впервые предложен Р. Medawar в конце 1940-х годов, после того как он обратил внимание на длительное выживание аллотрансплантатов кожи, помещенных в переднюю камеру глаза (ПК) [52]. Автор назвал обнаруженное им явление «иммунологической неосведомленностью» (immunological ignorance) — пассивным процессом изоляции чужеродных антигенов в ПК, которое объяснил отсутствием дренирующих лимфатических сосудов.

Позднее, в 1970-е годы, Kaplan Н. и Streilein J. продемонстрировали, что феномен, описанный П. Медаваром, по сути, является результатом активного и «девиантного» системного супрессивного иммунного ответа на антигены, помещенные в переднюю камеру глаза [46, 60].

Данное явление получило название иммунного отклонения, связанного с передней камерой глаза — ACAID (Anterior chamber-associated immune deviation) [73].

ACAID — форма иммунологической толерантности к антигенам, попадающим в переднюю камеру глаза, которая заключается в подавлении антиген-специфической реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при одновременной стимуляции гуморального иммунитета с продукцией антител, не фиксирующих комплекс [72, 78].

ТАБЛИЦА 1. ФАКТОРЫ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ИММУННУЮ И АНГИОГЕННУЮ ПРИВИЛЕГИЮ РОГОВИЦЫ*

TABLE 1. FACTORS INVOLVED IN IMMUNE AND ANGIOGENIC PRIVILEGE OF THE CORNEA*

Фактор Factor	Функция Function
Ангиостатин Angiostatin	Ингибирует пролиферацию сосудистых эндотелиальных клеток Inhibits vascular endothelial cell (VEC) proliferation
α -MSH	Подавляет продукцию $IFN\gamma$ Т-клетками, способствует развитию Tregs Suppresses $IFN\gamma$ production by T cells, promotes Treg development
CGRP	Подавляет продукцию NO макрофагами Suppresses NO production by macrophages
CRP	Ингибирует активацию системы комплемента Inhibits activation of the complement system
Эндостатин Endostatin	Способствует апоптозу сосудистых эндотелиальных клеток Promotes VEC apoptosis
Fas Ligand	Способствует апоптозу PMNs и Т-клеток Promotes apoptosis of PMNs and T cells
IDO	Способствует апоптозу Т-клеток, подавляет пролиферацию НК-клеток Promotes T cell apoptosis, suppresses NK cell proliferation
IL-1ra	Подавляет миграцию APC Suppresses APC migration
MIF	Подавляет НК-опосредованный цитолиз МНС класса I негативных клеток Inhibits NK cell-mediated cytolysis of MHC class I ⁻ cells
PDL-1	Способствует апоптозу Т-клеток, ингибирует пролиферацию Т-клеток и продукцию $IFN\gamma$ Promotes T cells apoptosis, inhibits T cells proliferation and $IFN\gamma$ production
PEDF	Подавляет экспрессию VEGF Suppresses VEGF expression
TGF- β	Подавляет НК-опосредованный цитолиз МНС класса I негативных клеток, подавляет активацию Т-клеток Inhibits NK cell-mediated cytolysis of MHC class I ⁻ cells, suppresses T cell activation
TRAIL	Способствует апоптозу Т-клеток и пролиферации Tregs Promotes T cell apoptosis and proliferation of Tregs
TSP-1	Подавляет созревание и миграцию APC и аллосенсилизацию Т-клеток Inhibits APC maturation and migration, and T cell allosensitization
VEGFR-1	Подавляет митогенную активность VEGF-A в отношении VECs Inhibits the mitogenic activity of VEGF-A on VECs
VEGFR-2	Подавляет ангиогенную активность VEGF-C Inhibits the angiogenic activity of VEGF-C
VEGFR-3	Подавляет гемангиогенез и лимфангиогенез, маскируясь под несигнальные рецепторы VEGF-C и VEGF-D Inhibits hemangiogenesis and lymphangiogenesis, decoy nonsignaling receptor for VEGF-C and VEGF-D
VIP	Подавляет активацию и пролиферацию Т-клеток Suppresses T cell activation and proliferation

Примечание. * – воспроизведено из [3].

Note. *, reprinted from [3].

В эксперименте на грызунах было показано, что F4/80⁺ антигенпрезентирующие клетки глаза, захватывая антигены в передней камере, через Шлеммов канал попадают в кровоток и мигрируют в краевую зону селезенки, где взаимодействуют с CD4⁺Т-лимфоцитами, $\gamma\delta$ Т-клетками, В- и NK-клетками, приводя к образованию двух групп антиген-специфических регуляторных Т-клеток (Tregs): CD4⁺CD25⁺Tregs и CD8⁺Tregs [78].

Принципиальная схема ACAID представлена на рисунке 1.

При сквозной кератопластике ортотопические аллотрансплантаты (слой эндотелиальных клеток роговицы) находятся в прямом контакте с передней камерой, и было высказано предположение, что антигены роговицы попадают в ПК во время трансплантации и вызывают ACAID [55].

В дальнейшем оно было подтверждено экспериментами Sonoda Y. и Streilein J.W., которые в модели на мышях с длительно сохраняющимися ортотопическими аллотрансплантатами роговицы показали антиген-специфическое подавление ГЗТ, напоминавшее ACAID [70]. Косвенное подтверждение получено в работах, продемонстрировавших, что отмена ACAID спленэктомией приводила к значительному увеличению отторжения донорского роговичного трансплантата [56].

Известно, что для индукции ACAID, помимо $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов, требуются по меньшей мере еще две другие субпопуляции Т-клеток: $\gamma\delta$ Т- и NKT-лимфоциты. Интересно, что у мышей, лишенных какой-либо из вышеуказанных популяций клеток, происходит аннулирование ACAID и резкое усиление иммунного отторжения аллотрансплантатов роговицы [68, 69].

В эксперименте, посвященном влиянию ACAID на пересадку роговицы, было показано, что индукция ACAID при интраокулярном введении аллогенных лимфоцитов в переднюю камеру глаза перед кератопластикой приводит к значительному улучшению приживления трансплантата роговицы у крыс [66].

Помимо иммунологической толерантности, индуцируемой ACAID, вклад в поддержание иммунной привилегии (имеющей чрезвычайно важное значение для успешного исхода кератопластики) вносят и другие механизмы.

Клетки роговицы (эндотелиального, эпителиального слоев) конститутивно синтезируют ряд мембраносвязанных молекул, защищающих ее от факторов воспаления, в частности через прямой контакт с активированными лимфоцитами.

Лиганд программируемой гибели клетки 1 – PDL-1 (Programmed death ligand 1) – это проапоп-

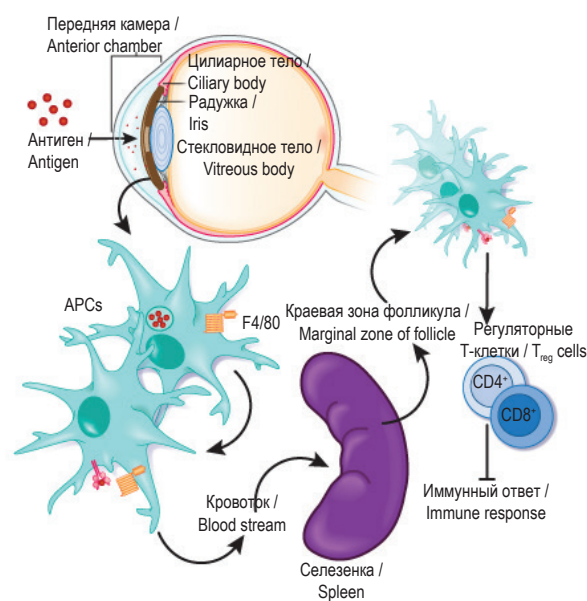


Рисунок 1. Схема ACAID

Примечание. Antigen – антиген, anterior chamber – передняя камера, ciliary body – цилиарное тело, iris – радужка, vitreous body – стекловидное тело, APCs – антигенпрезентирующие клетки, F4/80 – специфический маркер АПК, blood stream – кровоток, spleen – селезенка, marginal zone of follicle – краевая зона фолликула, T_{reg} cells – регуляторные Т-клетки, immune response – иммунный ответ. Воспроизведено с: https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/phenotypic/phenotypic_rec.cfm?pk=116.

Figure 1. ACAID mechanism

Note. APCs, antigen-presenting cells; F4/80, macrophage-specific marker; T_{reg} cells, regulatory T cells. Reprinted from: https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/phenotypic/phenotypic_rec.cfm?pk=116.

тотическая молекула, высокие уровни экспрессии которой наблюдают в эндотелии роговицы человека [40, 67]. Взаимодействие PDL-1 с рецептором PD-1 на поверхности Т-клеток приводит к ингибированию пролиферации Т-клеток, индукции апоптоза и ингибированию продукции IFN γ и, как следствие, лучшему приживлению трансплантата роговицы [67, 75, 89]. В недавних работах по экспериментальной кератопластике выявлены PDL-1-зависимые механизмы, способствующие выживанию донорской роговичной ткани. Так, истощение PDL-1 у реципиентов приводило к значительно более сильному непрямоу праймированию Т-клеток и быстрому отторжению трансплантата по сравнению с интактными животными [67]. Вместе с тем удаление PDL-1 из донорской ткани существенно не влияло на непрямо аллогенное распознавание, но способствовало повышенной аллореактивной инфильтрации Т-клеток и отторжению трансплантата [67].

Антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra) постоянно продуцируется и является постоянным компонентом ВПК здорового глаза, активно поддерживает АСАИД. В экспериментальной кератопластике были выделены два механизма, которые объяснили IL-1ra-зависимую блокировку аллоиммунитета и отторжения трансплантата через активное подавление сенсibilизации (праймирования аллодеструктивных клеток Th1) и/или формирование антиген-специфической толерантности (АСАИД) к донорским антигенам. Также было показано, что топическое введение IL-1ra стимулировало приживление донорских роговиц как в группе с низким, так и высоким риском его отторжения в эксперименте [84].

Тромбоспондин-1 (TSP-1) представляет собой гликопротеин, принадлежащий к семейству эволюционных высококонсервативных кальций-связывающих белков.

В глазу TSP-1 экспрессируется несколькими клеточными типами, а также обнаруживается во внутриглазных жидкостных средах ВПК и стекловидном теле. Известно, что этот белок поддерживает иммуносупрессирующие свойства ВПК, в частности через контроль продукции TGF- β 1 эпителием радужки, эндотелиальными клетками и АПК роговицы.

Более высокая частота отторжения трансплантата наблюдалась у null TSP-1 мышей по сравнению с животными дикого типа [63]. В ходе моделирования кератопластики в условиях воспаления было показано, что TSP-1, синтезируемый АПК, ингибирует созревание последних, регулирует миграцию в дренирующие лимфатические узлы и подавляет их способность к прямому праймированию Т-клеток [63, 65].

Клетки эпителия и эндотелия роговицы конститутивно экспрессируют проапоптотическую молекулу FasL (CD95L). Взаимодействие FasL с Fas (CD95) на поверхности мембран воспалительных клеток (нейтрофилов и эффекторных Т-клеток) приводит их к апоптотической гибели, способствуя выживанию донорской роговичной ткани [74].

Другим значимым трансмембранным белком, также конститутивно экспрессируемым клетками роговицы, является TRAIL (иначе Apo2L) — родственный фактору некроза опухоли лиганд, индуцирующий апоптоз (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) [50].

TRAIL вовлекается в процесс апоптоза активированных Т-клеток и стимулирует пролиферацию антиген-специфичных регуляторных Т-лимфоцитов [43].

Несмотря на отсутствие в доступной литературе данных о прямой ассоциации экспрессии TRAIL с выживанием роговичного трансплантата, в одной из работ было продемонстрировано, что трансфекция донорских мышинных роговиц аденовирусом, содержащим ген TRAIL, приводила к значимому улучшению приживления кератотрансплантата [43, 81].

Помимо описанных выше молекулярных факторов ВПК, во внутриглазной жидкости определяют ряд других растворимых иммунорегуляторных молекул, включая TGF- β ₂, регуляторные белки системы комплемента, альфа-меланоцит стимулирующий гормон (α -MSH), вазоактивный интестинальный пептид (VIP), кальцитонин-ген-связанный пептид (CGRP), соматостатин, а также индоламин 2,3-диоксигеназу (IDO). Данные факторы участвуют в индукции толерантности иммунокомпетентных клеток, регуляции АПК, ингибировании комплемента и клеточного лизиса, опосредованного NK-клетками [20, 54, 62, 85].

Аваскулярность роговицы: лимфо- и ангиогенная привилегия

В связи с отсутствием в роговице кровеносных и лимфатических сосудов перемещение иммунных клеток между роговицей и системным кровотоком/лимфоидными органами ограничено. Данная «привилегия» поддерживается за счет экспрессии ряда антилимфо- и антиангиогенных факторов.

Эпителий роговицы продуцирует растворимую рецепторную форму sVEGFR-1, связывающий VEGF-A, таким образом, ингибируя митогенный эффект последнего в отношении клеток эндотелия сосудов. Так же и sVEGFR-3 (несигнальный), конститутивно экспрессируемый клетками эпителия роговицы, проявляет антиангиогенную активность в качестве рецептора-ловушки для VEGF-C и VEGF-D, тем самым подавляя рост не только кровеносных, но и лимфатических сосудов [34]. В ходе эксперимента в модели на мышях было показано, что введение sVEGFR-3 приводило к блокаде лимфангиогенеза через 2 недели после кератопластики и значительно увеличению выживаемости аллотрансплантата по сравнению с контрольной группой животных [29].

Эпителиальные клетки и строма роговицы также секретируют растворимую форму sVEGFR-2, которая блокирует VEGF-C и предотвращает лимфангиогенез, не влияя на рост кровеносных сосудов [2]. Показано, что у мышей, не способных экспрессировать sVEGFR-2 при рождении, развивались роговицы с обильной сетью лимфа-

тических сосудов при отсутствии роста кровеносной сети. Интракорнеальное введение растворимого VEGFR-2 ингибировало образование лимфатических сосудов у нормальных мышей и значительно увеличивало выживаемость аллотрансплантата роговицы, даже если в ложе роговичного трансплантата имелась плотная сеть кровеносных сосудов, индуцированная операционными швами [2].

Лимфогенез лишает ткань роговицы ее иммунной привилегии, предоставляя возможность миграции АПК к региональному лимфатическому узлу, где они индуцируют активацию и клональную экспансию антиген-специфических Т-клеток.

Следует отметить, что в роговице экспрессируются и другие антиангиогенные факторы, такие как: ангиостатин, ингибирующий пролиферацию и миграцию клеток эндотелия сосудов [31], эндостатин, блокирующий митогенную активность VEGF-A в отношении клеток эндотелия сосудов и стимулирующий их апоптоз [48], фактор пигментного эпителия PEDF (Pigment epithelium-derived factor), синтезируемый также клетками эндотелия роговицы, регулирующий экспрессию VEGF-A по принципу обратной связи [51], описанный выше TSP-1, способный ингибировать гемангиогенез/лимфангиогенез через индукцию апоптоза клеток эндотелия кровеносных сосудов и CD36-зависимой отрицательной регуляции VEGF-C [25].

Субконъюнктивальное введение эндостатина у мышей перед пересадкой роговицы ингибирует неоваскуляризацию трансплантата и инфильтрацию Т-клеток, что приводит к значимому улучшению приживления трансплантата [77].

Антиангиогенная активность отмечена также для PDL-1. Так, индуцированное наложением швов воспаление роговицы у мышей-нокаут по PDL-1 приводило к более значимому ангиогенному ответу и более высоким уровням экспрессии мембранных VEGFR-2 по сравнению с мышами дикого типа [44].

Изменения микроокружения роговицы вследствие обширной травмы, воспалительного деструктивного процесса с активацией лимфо- и ангиогенеза ведут к срыву основных регуляторных механизмов поддержания иммунной привилегии переднего отрезка глаза.

Все это является важным условием для включения распознавательных и эффекторных механизмов трансплантационного иммунитета при пересадках роговицы и в дальнейшем с большой вероятностью может привести к развитию реак-

ции тканевой несовместимости и помутнению кератотрансплантата.

Роль антигенов гистосовместимости в развитии аллоиммунитета при трансплантации роговицы. МНС-типирование

Клетки всех слоев роговой оболочки, включая эпителиальные, клетки стромы и эндотелия, экспрессируют антигены МНС I класса. Молекулы МНС класса II в здоровой роговице экспрессируются только на ДК периферии, в то время как популяции дендритных и миелоидных клеток центральной зоны лишены этой экспрессии. Воспалительный стресс, как показывают исследования, способен активировать дендритные и эпителиальные клетки роговицы и стимулировать экспрессию МНС II класса в большинстве из них [20].

Известно, что в тактике клинической трансплантации солидных органов решающую роль играют два важных момента — подбор доноров максимально совместимых по генам HLA (МНС) и иммуносупрессия, однако указанные методы в практике пересадки роговицы применяются достаточно редко.

Несмотря на то, что еще в 70-х годах прошлого века был проведен целый ряд исследований эффективности HLA-типирования для профилактики развития отторжения роговичного трансплантата, единого мнения по данному вопросу в настоящее время нет. Результаты этих работ достаточно противоречивые: в некоторых из них представлены доказательства необходимости подбора совместимых доноров, особенно при кератопластике высокого риска [44], в других, как, например, в крупном рандомизированном исследовании эффективности HLA-типирования при пересадке роговицы CCTS (Collaborative corneal transplantation studies), не было показано существенной значимости этой процедуры [79].

По данным Reinhard T. и соавт., основными причинами неоднозначных результатов многоцентровых исследований, выполненных в прошлом, являются различные хирургические методы, отсутствие дифференциации в ситуациях кератопластики высокого риска и ошибки при HLA-типировании [61].

Эти же авторы провели собственное исследование эффективности подбора совместимых доноров по HLA I и II классов (A, B, DR) в однородной выборке из 398 пациентов при проникающей кератопластике низкого риска с использованием современных методов типирования (с соблюдением контроля качества), серологических для МНС I (локусы A и B) и молекулярно-генетических для МНС класса II (локус DR).

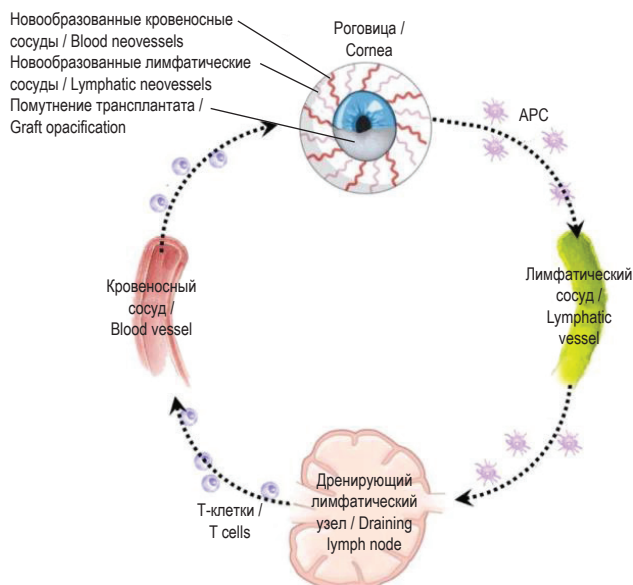


Рисунок 2. Механизм иммунного ответа на аллотрансплантат при кератопластике

Примечание. Cornea – роговица, APC – антигенпрезентирующие клетки, lymphatic vessel – лимфатический сосуд, draining lymph node – дренирующий лимфатический узел, T cells – Т-клетки, blood vessel – кровеносный сосуд, blood neovessels – новообразованные кровеносные сосуды, lymphatic neovessels – новообразованные лимфатические сосуды, graft opacification – помутнение трансплантата. Воспроизведено из [12].

Figure 2. Mechanism of alloimmune response in corneal transplantation

Note. APC, antigen-presenting cells. Reprinted from [12].

Было показано, что выживаемость трансплантата в чистом виде без отторжения в группе реципиентов, максимально совместимых с донором (имеющих число несоответствий 0-2), составила 91% и была статистически значимо выше по сравнению с таковой во II группе пациентов, где количество несоответствий по МНС локусам A/B/DR было в 2-3 раза больше [61].

Похожие результаты были получены в другом, практически аналогичном исследовании, но выполненном в условиях кератопластики высокого риска: здесь авторы также продемонстрировали статистически значимое, более длительное выживание роговичных трансплантатов у реципиентов с наименьшим количеством несоответствий по антигенам HLA-DR с донором [7].

Роль минорных антигенов гистосовместимости при проникающей кератопластике, в том числе и высокого риска, в эксперименте на грызунах была продемонстрирована в работах Streilein J. и соавт. [72].

Результаты анализа большого объема клинического материала, проведенного Bohringer D.,

показали, что при совпадении донорского материала по минорному HLA-A1/HY с реципиентом выживаемость трансплантата достигла в 88% случаев, что было значимо выше, чем в группе пациентов, несовместимых по этому антигену с донорами [10].

В целом, несмотря на достаточное количество данных, доказывающих, что определение доноров, совместимых по МНС II с реципиентом, может повысить выживаемость роговичного трансплантата у пациентов с высоким риском его отторжения, высокая стоимость процедуры типирования и отсутствие единого мнения о ее эффективности нуждаются в проведении больших рандомизированных клинических испытаний с применением современных молекулярно-биологических методов типирования.

Значимость прямого и непрямого механизмов аллогенного распознавания

Отторжение кератотрансплантата представляет собой сложный процесс, при котором изменения микроокружения роговицы, взаимодействие между клетками врожденной и приобретенной иммунной защиты приводят к разрушению донорской роговичной ткани.

Известно, что умеренное повышение экспрессии провоспалительных медиаторов и молекул адгезии является закономерным тканевым ответом на оперативное вмешательство при кератопластике даже в отсутствие факторов риска [32, 87].

Активное воспаление приводит к повышенной экспрессии белков МНС II класса и стимулирующих молекул CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) и CD40 на поверхности как инфильтрирующих (реципиента), так и резидентных (донора) АПК роговицы.

В таких условиях АПК роговицы донора, в норме не стимулирующие Т-клетки, становятся более активными в отношении презентации аллоантигенов и праймирования наивных Т-лимфоцитов в Th1-эффекторы, основные медиаторы острого отторжения трансплантата роговицы [35]. Помимо этого, индуцированный активным воспалительным процессом синтез молекул адгезии и хемоаттрактантных цитокинов способствует мобилизации АПК реципиента из перикорнеальной лимбальной сосудистой сети в сторону трансплантата роговицы [35].

Воспалительный процесс в роговице, в норме являющейся аваскулярной тканью, приводит к формированию новообразованных кровеносных и лимфатических сосудов [2, 28, 29], способствуя миграции АПК в дренирующие лимфатические узлы и праймированию Т-лимфоцитов [20].

Накопление провоспалительных цитокинов, активная экспрессия молекул адгезии ICAM-1, хемоаттрактантных медиаторов CCL-2, CCL-20 усиливают инфильтрацию роговичной ткани клетками врожденной иммунной системы, стимулирующих лимфангиогенез за счет продукции VEGF-C и VEGF-D [12]. На рисунке 2 представлен механизм аллоиммунного ответа при кератопластике [12].

VEGF-C, в свою очередь, как было показано, через взаимодействие с мембранным VEGFR-3, экспрессируемым АПК в процессе их созревания, стимулирует миграцию последних в лимфоидные органы [19]. Миграция АПК по афферентному пути также зависит от взаимодействия между рецептором CCR7 на их поверхности и лиганда CCL21, усиленно экспрессируемого клетками эндотелия лимфатических сосудов при воспалении [45].

Роль лимфатических сосудов для развития аллосенсибилизации подтверждается значимо более высокими показателями миграции АПК и большой частотой отторжения кератотрансплантата при наличии ложа с новообразованными сосудами, особенно лимфатическими, по сравнению с аваскулярными [6]. Более того, ограничение доступа АПК к дренирующим лимфатическим узлам после ипсилатеральной цервикальной лимфаденэктомии перед трансплантацией роговицы приводило к значимому улучшению приживления трансплантата у мышей. Данный факт подтверждает роль лимфатической системы в усилении аллосенсибилизации [86].

Аллосенсибилизация, или праймирование, Т-лимфоцитов происходит по двум основным механизмам. Прямой механизм аллосенсибилизации включает презентирование аллоантигенов Т-лимфоцитам реципиента (чаще всего CD8⁺), активно привлекаемым АП клетками донора (иначе называемыми лейкоцитами-«пассажирами») [42].

При непрямом пути резидентные АП клетки периферических слоев роговицы (трансплантационного ложа реципиента) презентуют донорские АГ в контексте собственных МНС Т-лимфоцитам в дренирующих лимфатических сосудах [42]. Ранее не прямой путь аллосенсибилизации рассматривали как основную, если не единственную, форму иммунного ответа на все трансплантаты роговицы [64]. Вместе с тем наличие в роговице популяций клеток костномозгового происхождения, экспрессирующих МНС класса II в условиях воспалительного процесса и функционально готовых к процессингу

и презентации антигена, позволило переосмыслить роль прямого прайминга Т-лимфоцитов при трансплантации роговицы [36].

Более того, накопленное достаточное количество данных позволило предположить, что соотношение прямого и непрямого пути аллогенного распознавания в значительной мере зависит от клеточного микроокружения ложа трансплантата [42]. При наличии невоспаленного ложа с минимальной экспрессией молекул МНС не прямой путь остается основным. Напротив, воспалительный процесс и высокий уровень экспрессии МНС, костимулирующих молекул антигенпрезентирующими клетками являются детерминирующими для развития прямого пути аллосенсибилизации [42].

Эффекторные иммунные клетки и механизмы деструкции роговичного трансплантата

CD4⁺Th1-клетки, продуцирующие IFN γ , принято рассматривать как преобладающие эффекторные клетки в развитии реакции тканевой несовместимости при пересадках роговицы [39], однако механизмы, с помощью которых Th1-клетки опосредуют отторжение трансплантата, не выяснены.

Показано, что аллореактивные CD4⁺T-клетки способны индуцировать апоптотическую гибель эндотелиальных клеток роговицы в эксперименте [15]. Вместе с тем блокировка пути Fas/FasL не приводила к ингибированию апоптоза клеток роговицы, опосредованного CD4 Т-лимфоцитами [39]. Высокие уровни экспрессии IFN γ и IL-2 в роговице при ее отторжении свидетельствовали о важной роли Th1-клеток при отторжении трансплантата роговицы, однако при введении анти-CD4 антител мышам в условиях экспериментальной кератопластики более чем в трети случаев наблюдали отторжение трансплантата; аналогичные результаты отмечены при пересадках роговицы мышам-нокаутам по CD4⁺: в этом случае реакция тканевой несовместимости развивалась у 45% животных. Эти данные указывают на существование независимых от CD4-механизмов, участвующих в отторжении трансплантата [82]. Кроме того, исследования, посвященные временной динамике отторжения кератотрансплантата у мышей-нокаут по IFN γ , демонстрировали, что реакция тканевой несовместимости развивалась только у 70% животных при МНС-несоответствии пары донор — реципиент и не отмечена ни в одном из случаев полного совпадения, что также может свидетельствовать о наличии других механизмов реакции отторжения трансплантата [82].

В течение длительного времени считалось, что «отклонение» вектора поляризации в сторону развития Th2-аллоиммунного ответа способствует приживлению аллотрансплантата роговицы.

Этому способствовали исследования Yamada и соавт., которые показывали, что «девиация» аллоиммунного ответа в сторону Th2-фенотипа улучшала приживление ортотопического трансплантата роговицы у мышей в условиях экспериментальной кератопластики высокого риска [83].

Однако другие работы представили более высокую частоту отторжения трансплантата роговицы у пациентов с atopическим (аллергическим) конъюнктивитом, при котором также происходит активация Th2-иммунного ответа [8].

Также показано, что отторжение трансплантата роговицы у мышей-нокаут по $IFN\gamma$ характеризуется наличием эозинофильных инфильтратов роговицы и потенцируется Th2 [37].

Несмотря на то, что существует общее мнение о том, что Th1-клетки являются главными эффекторами острого отторжения роговичного трансплантата, очевидно, что деплеция $CD4^+$ Т-клеток и $IFN\gamma$ не приводит к полному подавлению аллореактивности, что, в свою очередь, свидетельствует о наличии других эффекторных путей, включающих, в частности, Th2-клетки [8].

Роль Th17-лимфоцитов, вовлеченных в патогенез ряда аутоиммунных заболеваний (в том числе и органа зрения) [13, 27], хорошо известна также в трансплантационной иммунологии, в частности, доказано участие этих клеток в отторжении трансплантатов при пересадках солидных органов, а также в реакции «трансплантат против хозяина» [47].

На моделях ортотопической трансплантации роговицы у мышей показано, что Th17-клетки вовлекаются на ранних стадиях развития реакции тканевой несовместимости, в то время как Th1-клетки, продуцирующие $IFN\gamma$, в основном подключаются на более поздних сроках и имеют решающее значение при окончательном отторжении роговичного трансплантата [18, 47].

Предполагают, что пролимфоангиогенная активность Th17/IL-17, продемонстрированная в модели аутоиммунного воспалительного заболевания глазной поверхности на мышах [14], препятствует выживанию трансплантата при ортотопической пересадке роговицы.

Вместе с тем у 90% мышей-нокаут по IL-17 и животных, которым вводили анти-IL-17 антитела, отмечено отторжение аллотрансплантата роговицы [18, 22].

Интересно, что дефицит IL-17 замедляет развитие отторжения и стимулирует экспрессию цитокинов Th2-типа, IL-4, IL-5 и IL-13 [18].

Эти данные, наряду с наблюдениями за частотой отторжения трансплантата роговицы у мышей, нокаутированных по $IFN\gamma$, свидетельствуют, что выключение Th1- и Th17-путей приводит к смещению в сторону Th2-опосредованного иммунного ответа, способного играть отрицательную роль в выживании донорской ткани [18, 22].

В одной из работ было показано, что IL-17 стимулирует образование $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ антиген-специфических регуляторных Т-клеток в трансплантатах роговицы и необходим для проявления их иммуносупрессивной функции в отношении эффекторных $CD4^+$ Т-клеток [23].

Исследования, посвященные изучению роли $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов в отторжении трансплантата, представили также противоречивые результаты.

Так, в одних работах показана роль аллоспецифических $CD8^+$ Т-клеток при высоком риске отторжения трансплантата, в то время как другие авторы сообщают, что отторжение донорской ткани происходило неизменно как в группе мышей с дефицитом перфорины, так и у животных с деплецией $CD8^+$ Т-лимфоцитов [59].

В целом результаты показывают, что ответ $CD8^+$ Т-клеток не является абсолютно необходимым для реакции отторжения роговичного трансплантата.

Несмотря на праймирование $CD8^+$ Т-клеток, последние, по данным Boisgerault F., не способны привести к отторжению аллогенной роговичной ткани [11].

Считают, что в развитие реакции тканевой несовместимости при трансплантации роговицы вовлечены также $CD4^+CD8^-$ лимфоциты, или двойные негативные Т-клетки [58]. Так, адаптивный перенос $CD4^+CD8^-$ клеток SCID мышам приводил к развитию острой реакции отторжения роговичного трансплантата [58]. Однако точная роль двойных негативных Т-лимфоцитов в отторжении трансплантата остается неясной.

Регуляторные иммунные клетки: индукция аллогенной толерантности и приживление трансплантата роговицы

Одной из основных задач трансплантационной иммунологии является индукция донор-специфической толерантности, которая устраняет необходимость в иммуносупрессивной терапии и способствует выживанию трансплантата. Потенциальными кандидатами для индукции аллотолерантности при пересадке роговицы могут выступать толерогенные антиген-специ-

фичные регуляторные Т-лимфоциты (Tregs) и дендритные клетки (ДК) [38].

Показано, что нечувствительные к матурации (созреванию) толерогенные дендритные клетки, экспрессирующие пониженные уровни МНС II и костимулирующих молекул, участвуют в подавлении аллоиммунитета и способствуют выживанию трансплантатов солидных органов [53, 90].

Исследования с использованием мышиной модели сквозной кератопластики показали, что введение донорских толерогенных ДК реципиенту перед пересадкой роговицы повышает количество FoxP3^{hi}Tregs лимфоцитов и значительно улучшает приживление трансплантата [80].

Результаты недавнего исследования показывают, что потенциальный эффект толерогенных ДК-клеток на приживление трансплантата роговицы опосредован активной пролиферацией экспрессирующих CTLA-4 Tregs [88].

В связи с тем, что толерогенные ДК стимулируют аллотолерантность посредством увеличения количества Tregs, большинство исследований сосредоточены на модификации функции этой субпопуляции для обеспечения приживления трансплантата [33].

Целый ряд работ представил убедительные доказательства способности аллоспецифических Tregs подавлять гиперчувствительность замедленного типа и повышать выживаемость трансплантатов роговицы в условиях экспериментальной кератопластики [24, 33]. Образование и экспансия Tregs в трансплантате роговицы осуществляются посредством активации экспрессируемого в роговичной ткани GITRL-лиганда, связывающего индуцированный глюкокортикоидами рецептор фактора некроза опухоли (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand) [40]. Исследования функции Tregs показали, что осуществляемая Treg супрессия эффекторных Т-клеток зависит от контакта и опосредуется мембраносвязанными GITRL и CTLA-4 [24]. Экспрессия указанных молекул, а также FoxP3 на Tregs регулируется IL-17, необходимым для образования этих клеток; применение анти-IL-17 антител в 90% случаев приводило к отторжению трансплантата роговицы [24].

Результаты работ, посвященных особенностям выживания трансплантатов солидных органов (почек) продемонстрировали, что их успешное приживление ассоциировалось со значимым повышением количества Tregs как в материале донора, так и в дренирующих лимфатических узлах [9].

В аналогичном исследовании Chauhan S., выполненном в условиях экспериментальной ке-

ратопластики, не было отмечено значимых различий между группами животных с успешным приживлением трансплантата и отторжением донорского материала, однако выявлены более высокие уровни экспрессии FoxP3 в Tregs дренирующих лимфатических узлов при благополучных исходах пересадок роговицы, значимо отличающиеся от таковых у реципиентов при развитии реакции отторжения трансплантата [17].

В этой же работе был сделан очень важный вывод, подтвержденный в дальнейшем Arvey A., о том, что функциональная активность Tregs связана с выживанием аллотрансплантата и зависит от экспрессии ими FoxP3: FoxP3^{hi}Tregs более склонны к подавлению пролиферации Т-клеток и образованию регуляторных иммуносупрессивных факторов роста IL-10 и TGF- β [5, 17].

При детальных исследованиях взаимодействия Tregs и АПК при пересадках роговицы было обнаружено, что в случаях успешного приживления донорского материала Tregs локализовались в тесной близости к АПК паракортикальной зоны дренирующих лимфатических узлов и демонстрировали высокий уровень экспрессии CCR7 (CCR7^{hi}Tregs), напротив, при отторжении трансплантата эти клетки отличались пониженной экспрессией CCR7 и находились в меньшем контакте с АПК [16].

CCR7^{hi}Tregs обладают более значимым ингибиторным эффектом в отношении пролиферации Т-клеток, отличаются способностью к повышенной секреции иммуносупрессорных цитокинов. Стимуляция Tregs с помощью CCL21 в эксперименте *in vitro*, как было показано Chauhan и соавт., приводит к положительной регуляции экспрессии CCR7 и улучшает хоминг-эффект Tregs в дренирующие лимфатические узлы, что значительно улучшает приживление трансплантата роговицы [16].

В недавнем исследовании при кератопластике в эксперименте Tahvildari и соавт. обнаружено, что дисфункцию Treg можно предотвратить при системном введении небольших доз IL-2. Так, инъекции низких доз IL-2 мышам с высоким риском отторжения трансплантата приводили к экспансии и повышению функциональной активности Tregs, снижению лейкоцитарной инфильтрации аллогенной роговицы и значительному улучшению ее приживления [76].

Новым концептуальным взглядом в современной иммунологии, привлекающим в последнее время повышенное внимание, является состояние функциональной нестабильности Tregs, или «пластичности Tregs», в условиях воспалительного микроокружения. Показано, что при

наличии воспаления экспрессия FoxP3 в Tregs нестабильна, а сами клетки приобретают (демонстрируют) фенотип патогенной эффекторной Т-клетки памяти и продуцируют IFN γ , и некоторыми исследователями называются “exTregs” (от англ. exhibit — демонстрировать) [49, 91].

Так, Foulsham W. и соавт. провели исследование патологической конверсии Tregs в условиях экспериментальной кератопластики высокого риска с использованием трансгенных мышей FoxP3 — lineage [30]. Результаты показали, что воспалительный процесс в глазу (обычно имеющий место при трансплантации высокого риска) приводил к потере экспрессии FoxP3 этой регуляторной субпопуляцией лимфоцитов с изменением их в exTregs, фенотипически идентичные эффекторным Th1-клеткам, играющим одну из ключевых ролей в отторжении трансплантата.

Несмотря на то, что феномен патологической конверсии Tregs в настоящее время известен и описан, например при ревматоидном артрите [49], эти данные являются новыми для понимания роли и места exTregs в механизмах нарушения иммунной привилегии глаза и развитии реакции тканевой несовместимости при пересадках роговицы (особенно кератопластике высокого риска).

Заключение

Развитие реакции отторжения трансплантата при пересадке роговицы остается сложным биологическим процессом, включающим взаимодействие между клетками донора, реципиента и лимфососудистой системой.

Благодаря активно развивающейся экспериментальной офтальмоиммунологии, в последние годы произошло значительное накопление знаний в области патофизиологии реакции тканевой несовместимости при трансплантации роговицы.

Показано, что прозрачное приживление донорской роговичной ткани, при условии отсутствия факторов риска, обусловлено иммунной привилегией глаза (в частности, особым функционально-структурным взаимодействием роговицы и передней камеры (ПК)), реализуемой посредством локальных и системных механизмов, как феномен иммунного отклонения, связанный с ПК глаза (ACAID); иммуносупрессорные компоненты ее внутренней жидкой среды — водянистой влаги (ВПК); мембраноассоциированные иммунологически активные молекулы клеток эндотелия роговицы, а также факторы, участвующие в поддержании аваскулярности роговичной ткани.

Нарушение иммунной привилегии глаза создает условия для активации распознавания, включения эффекторных механизмов трансплантационного иммунитета и является главным фактором риска развития реакции тканевой несовместимости и помутнения кератотрансплантата.

Эти исследования дали направления на разработку новых терапевтических решений, среди которых перспективными представляются подходы, затрагивающие афферентное и эфферентное звено иммунитета локально, на молекулярном уровне, без вовлечения системного иммунного ответа.

Список литературы / References

1. Кильдюшов Е.М., Золоторевский А.В., Доронина О.А., Агафонова А.А. Перспективы развития кератопластики в Москве // Офтальмология, 2013. Т. 10, № 2. С. 5-7. [Kildyushov E.M., Zolotarevsky A.V., Doronina O.A., Agafonova A.A. Development prospects of keratoplasty in Moscow. *Oftalmologiya = Ophthalmology*, 2013, Vol. 10, no. 2, pp. 5-7. (In Russ.)]
2. Albuquerque R.J., Hayashi T., Cho W.G., Kleinman M.E., Dridi S., Takeda A., Baffi J.Z., Yamada K., Kaneko H., Green M.G., Chappell J., Wilting J., Weich H.A., Yamagami S., Amano S., Mizuki N., Alexander J.S., Peterson M.L., Brekken R.A., Hirashima M., Capoor S., Usui T., Ambati B.K., Ambati J. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, pp. 1023-1030.
3. Amouzegar A., Chauhan S.K., Dana R. Alloimmunity and Tolerance in corneal transplantation. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 10, pp. 3983-3991.
4. Anshu A., Price M.O., Price F.W., Jr. Risk of corneal transplant rejection significantly reduced with Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmology*, 2012, Vol. 119, no. 3, pp. 536-540.
5. Arvey A., van der Veeken J., Samstein R.M., Feng Y., Stamatoyannopoulos J.A., Rudensky A.Y. Inflammation-induced repression of chromatin bound by the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 6, pp. 580-587.

6. Bachmann B.O., Bock F., Wiegand S.J., Maruyama K., Dana M.R., Kruse F.E., Luetjen-Drecoll E., Cursiefen C. Promotion of graft survival by vascular endothelial growth factor a neutralization after high-risk corneal transplantation. *Arch. Ophthalmol.*, 2008, Vol. 126, no. 1, pp. 71-77.
7. Bartels M.C., Doxiadis I.I., Colen T.P., Beekhuis W.H. Long-term outcome in high-risk corneal transplantation and the influence of HLA-A and HLA-B matching. *Cornea*, 2003, Vol. 22, no. 6, pp. 552-556.
8. Beauregard C., Stevens C., Mayhew E., Niederkorn J.Y. Cutting edge: atopy promotes Th2 responses to alloantigens and increases the incidence and tempo of corneal allograft rejection. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 11, pp. 6577-6581.
9. Bestard O., Cruzado J.M., Rama I., Torras J., Goma M., Seron D., Moreso F., Gil-Vernet S., Grinyo J.M. Presence of FoxP3⁺ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2008, Vol. 19, no. 10, pp. 2020-2026.
10. Bohringer D., Spierings E., Enczmann J., Bohringer S., Sundmacher R., Goulmy E., Reinhard T. Matching of the minor histocompatibility antigen HLA-A1/H-Y may improve prognosis in corneal transplantation. *Transplantation*, 2006, Vol. 82, no. 8, pp. 1037-1041.
11. Boisgerault F., Liu Y., Anosova N., Ehrlich E., Dana M.R., Benichou G. Role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in allorecognition: lessons from corneal transplantation. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 4, pp. 1891-1899.
12. Chauhan S.K., Dohlman T.H., Dana R. Corneal lymphatics: Role in ocular inflammation as inducer and responder of adaptive immunity. *J. Clin. Cell. Immunol.*, 2014, Vol. 5, pii: 1000256. doi: 10.4172/2155-9899.1000256.
13. Chauhan S.K., El Annan J., Ecoiffier T., Goyal S., Zhang Q., Saban D.R., Dana R. Autoimmunity in dry eye is due to resistance of Th17 to Treg suppression. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 3, pp. 1247-1252.
14. Chauhan S.K., Jin Y., Goyal S., Lee H.S., Fuchsluger T.A., Lee H.K., Dana R. A novel pro-lymphangiogenic function for Th17/IL-17. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 17, pp. 4630-4634.
15. Chauhan S.K., Jurkunas U., Funaki T., Dastjerdi M., Dana R. Quantification of allospecific and nonspecific corneal endothelial cell damage after corneal transplantation. *Eye (Lond.)*, 2015, Vol. 29, no. 1, pp. 136-144.
16. Chauhan S.K., Saban D.R., Dohlman T.H., Dana R. CCL-21 conditioned regulatory T cells induce allotolerance through enhanced homing to lymphoid tissue. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 2, pp. 817-823.
17. Chauhan S.K., Saban D.R., Lee H.K., Dana R. Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 1, pp. 148-153.
18. Chen H., Wang W., Xie H., Xu X., Wu J., Jiang Z., Zhang M., Zhou L., Zheng S. A pathogenic role of IL-17 at the early stage of corneal allograft rejection. *Transpl. Immunol.*, 2009, Vol. 21, no. 3, pp. 155-161.
19. Chen L., Hamrah P., Cursiefen C., Zhang Q., Pytowski B., Streilein J.W., Dana M.R. Vascular endothelial growth factor receptor-3 mediates induction of corneal alloimmunity. *Nat. Med.*, 2004, Vol. 10, no. 8, pp. 813-815.
20. Chong E.M., Dana M.R. Graft failure IV. Immunologic mechanisms of corneal transplant rejection. *Int. Ophthalmol.*, 2008, Vol. 28, no. 3, pp. 209-222.
21. Coster D.J., Williams K.A. The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation. *Am. J. Ophthalmol.*, 2005, Vol. 140, no. 6, pp. 1112-1122.
22. Cunnusamy K., Chen P.W., Niederkorn J.Y. IL-17 promotes immune privilege of corneal allografts. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 8, pp. 4651-4658.
23. Cunnusamy K., Chen P.W., Niederkorn J.Y. IL-17A-dependent CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells promote immune privilege of corneal allografts. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 12, pp. 6737-6745.
24. Cunnusamy K., Paunicka K., Reyes N., Yang W., Chen P.W., Niederkorn J.Y. Two different regulatory T cell populations that promote corneal allograft survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2010, Vol. 51, no. 12, pp. 6566-6574.
25. Cursiefen C., Maruyama K., Bock F., Saban D., Sadrai Z., Lawler J., Dana R., Masli S. Thrombospondin 1 inhibits inflammatory lymphangiogenesis by CD36 ligation on monocytes. *J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 208, no. 5, pp. 1083-1092.
26. Dana M.R., Qian Y., Hamrah P. Twenty-five-year panorama of corneal immunology: emerging concepts in the immunopathogenesis of microbial keratitis, peripheral ulcerative keratitis, and corneal transplant rejection. *Cornea*, 2000, Vol. 19, no. 5, pp. 625-643.
27. Dohlman T.H., Chauhan S.K., Kodati S., Hua J., Chen Y., Omoto M., Sadrai Z., Dana R. The CCR6/CCL20 axis mediates Th17 cell migration to the ocular surface in dry eye disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2013, Vol. 54, no. 6, pp. 4081-4091.
28. Dohlman T.H., Omoto M., Hua J., Stevenson W., Lee S.M., Chauhan S.K., Dana R. VEGF-trap aflibercept significantly improves long-term graft survival in high-risk corneal transplantation. *Transplantation*, 2015, Vol. 99, no. 4, pp. 678-686.
29. Emami-Naeini P., Dohlman T.H., Omoto M., Hattori T., Chen Y., Lee H.S., Chauhan S.K., Dana R. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-3 suppresses allosensitization and promotes corneal allograft survival. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2014, Vol. 252, no. 11, pp. 1755-1762.
30. Foulsham W., Marmalidou A., Amouzegar A., Coco G., Chen Y., Dana R. The function of regulatory T cells at the ocular surface: Review. *Ocul. Surf.*, 2017, Vol. 15, no. 4, pp. 652-659.

31. Gabison E., Chang J.H., Hernandez-Quintela E., Javier J., Lu P.C., Ye H., Kure T., Kato T., Azar D.T. Anti-angiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. *Exp. Eye Res.*, 2004, Vol. 78, no. 3, pp. 579-589.
32. Grimaldo S., Yuen D., Ecoiffier T., Chen L. Very late antigen-1 mediates corneal lymphangiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011, Vol. 52, no. 7, pp. 4808-4812.
33. Guo X., Jie Y., Ren D., Zeng H., Zhang Y., He Y., Pan Z. *In vitro*-expanded CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells controls corneal allograft rejection. *Hum. Immunol.*, 2012, Vol. 73, no. 11, pp. 1061-1067.
34. Hajrasouliha A.R., Funaki T., Sadrai Z., Hattori T., Chauhan S.K., Dana R. Vascular endothelial growth factor-C promotes alloimmunity by amplifying antigen-presenting cell maturation and lymphangiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2012, Vol. 53, no. 3, pp. 1244-1250.
35. Hamrah P., Liu Y., Zhang Q., Dana M.R. Alterations in corneal stromal dendritic cell phenotype and distribution in inflammation. *Arch. Ophthalmol.*, 2003, Vol. 121, no. 8, pp. 1132-1140.
36. Hamrah P., Zhang Q., Liu Y., Dana M.R. Novel characterization of MHC class II-negative population of resident corneal Langerhans cell-type dendritic cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002, Vol. 43, no. 3, pp. 639-646.
37. Hargrave S.L., Hay C., Mellon J., Mayhew E., Niederkorn J.Y. Fate of MHC-matched corneal allografts in Th1-deficient hosts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004, Vol. 45, no. 4, pp. 1188-1193.
38. Hattori T., Saban D.R., Emami-Naeini P., Chauhan S.K., Funaki T., Ueno H., Dana R. Donor-derived, tolerogenic dendritic cells suppress immune rejection in the indirect allosensitization-dominant setting of corneal transplantation. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, Vol. 91, no. 4, pp. 621-627.
39. Hegde S., Beauregard C., Mayhew E., Niederkorn J.Y. CD4(+) T-cell-mediated mechanisms of corneal allograft rejection: role of Fas-induced apoptosis. *Transplantation*, 2005, Vol. 79, no. 1, pp. 23-31.
40. Hori J., Taniguchi H., Wang M., Oshima M., Azuma M. GITR ligand-mediated local expansion of regulatory T cells and immune privilege of corneal allografts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2010, Vol. 51, no. 12, pp. 6556-6565.
41. Hori J., Wang M., Miyashita M., Tanemoto K., Takahashi H., Takemori T., Okumura K., Yagita H., Azuma M. B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 9, pp. 5928-5935.
42. Huq S., Liu Y., Benichou G., Dana M.R. Relevance of the direct pathway of sensitization in corneal transplantation is dictated by the graft bed microenvironment. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 7, pp. 4464-4469.
43. Ikeda T., Hirata S., Fukushima S., Matsunaga Y., Ito T., Uchino M., Nishimura Y., Senju S. Dual effects of TRAIL in suppression of autoimmunity: the inhibition of Th1 cells and the promotion of regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 9, pp. 5259-5267.
44. Jin Y., Chauhan S.K., El Annan J., Sage P.T., Sharpe A.H., Dana R. A novel function for programmed death ligand-1 regulation of angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 2011, Vol. 178, no. 4, pp. 1922-1929.
45. Johnson L.A., Jackson D.G. Inflammation-induced secretion of CCL21 in lymphatic endothelium is a key regulator of integrin-mediated dendritic cell transmigration. *Int. Immunol.*, 2010, Vol. 22, no. 10, pp. 839-849.
46. Kaplan H.J., Streilein J.W. Immune response to immunization via the anterior chamber of the eye. II. An analysis of F1 lymphocyte-induced immune deviation. *J. Immunol.*, 1978, Vol. 120, no. 3, pp. 689-693.
47. Kappel L.W., Goldberg G.L., King C.G., Suh D.Y., Smith O.M., Ligh C., Holland A.M., Grubin J., Mark N.M., Liu C., Iwakura Y., Heller G., van den Brink M.R. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 4, pp. 945-952.
48. Kim Y.M., Hwang S., Pyun B.J., Kim T.Y., Lee S.T., Gho Y.S., Kwon Y.G. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, no. 31, pp. 27872-27879.
49. Komatsu N., Okamoto K., Sawa S., Nakashima T., Oh-hora M., Kodama T., Tanaka S., Bluestone J.A., Takayanagi H. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat. Med.*, 2014, Vol. 20, no. 1, pp. 62-68.
50. Lee H.O., Herndon J.M., Barreiro R., Griffith T.S., Ferguson T.A. TRAIL: a mechanism of tumor surveillance in an immune privileged site. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 9, pp. 4739-4744.
51. Matsui T., Nishino Y., Maeda S., Yamagishi S. PEDF-derived peptide inhibits corneal angiogenesis by suppressing VEGF expression. *Microvasc. Res.*, 2012, Vol. 84, no. 1, pp. 105-108.
52. Medawar P.B. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1948, Vol. 29, no. 1, pp. 58-69.
53. Min W.P., Gorczynski R., Huang X.Y., Kushida M., Kim P., Obataki M., Lei J., Suri R.M., Catral M.S. Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, no. 1, pp. 161-167.
54. Namba K., Kitaichi N., Nishida T., Taylor A.W. Induction of regulatory T cells by the immunomodulating cytokines alpha-melanocyte-stimulating hormone and transforming growth factor-beta2. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, Vol. 72, no. 5, pp. 946-952.
55. Niederkorn J.Y. Anterior chamber-associated immune deviation and its impact on corneal allograft survival. *Curr. Opin. Organ Transplant.*, 2006, Vol. 11, no. 4, pp. 360-365.
56. Niederkorn J.Y. The immune privilege of corneal grafts. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, Vol. 74, no. 2, pp. 167-171.

57. Niederkorn J.Y., Chen P.W., Mellon J., Stevens C., Mayhew E. Allergic airway hyperreactivity increases the risk for corneal allograft rejection. *Am. J. Transplant.*, 2009, Vol. 9, no. 5, pp. 1017-1026.
58. Niederkorn J.Y., Stevens C., Mellon J., Mayhew E. CD4⁺ T-cell-independent rejection of corneal allografts. *Transplantation*, 2006, Vol. 81, no. 8, pp. 1171-1178.
59. Niederkorn J.Y., Stevens C., Mellon J., Mayhew E. Differential roles of CD8⁺ and CD8⁻ T lymphocytes in corneal allograft rejection in 'high-risk' hosts. *Am. J. Transplant.*, 2006, Vol. 6, no. 4, pp. 705-713.
60. Niederkorn J.Y. High risk corneal allografts and why they lose their immune privilege. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 5, pp. 493-497.
61. Reinhard T., Böhringer D., Enczmann J., Kögler G., Mayweg S., Wernet P., Sundmacher R. HLA class I and II matching improves prognosis in penetrating normal-risk keratoplasty. *Dev. Ophthalmol.*, 2003, Vol. 36, pp. 42-49.
62. Ryu Y.H., Kim J.C. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human corneal cells as a local immunosuppressive factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2007, Vol. 48, no. 9, pp. 4148-4152.
63. Saban D.R., Bock F., Chauhan S.K., Masli S., Dana R. Thrombospondin-1 derived from APCs regulates their capacity for allosensitization. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 8, pp. 4691-4697.
64. Sano Y., Streilein J.W., Ksander B.R. Detection of minor alloantigen-specific cytotoxic T cells after rejection of murine orthotopic corneal allografts: evidence that graft antigens are recognized exclusively via the "indirect pathway". *Transplantation*, 1999, Vol. 68, no. 7, pp. 963-970.
65. Schöllhorn L., Bock F., Cursiefen C. Thrombospondin-1 as a regulator of corneal inflammation and lymphangiogenesis: Effects on dry eye disease and corneal graft immunology. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 2015, Vol. 31, no. 7, pp. 376-385.
66. She S.C., Steahly L.P., Moticka E.J. Intracameral injection of allogeneic lymphocytes enhances corneal graft survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1990, Vol. 31, no. 10, pp. 1950-1956.
67. Shen L., Jin Y., Freeman G.J., Sharpe A.H., Dana M.R. The function of donor versus recipient programmed death-ligand 1 in corneal allograft survival. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 6, pp. 3672-3679.
68. Skelsey M.E., Mellon J., Niederkorn J.Y. Gamma delta T cells are needed for ocular immune privilege and corneal graft survival. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, no. 7, pp. 4327-4333.
69. Sonoda K.H., Taniguchi M., Stein-Streilein J. Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 4, pp. 2028-2034.
70. Sonoda Y., Streilein J.W. Impaired cell-mediated immunity in mice bearing healthy orthotopic corneal allografts. *J. Immunol.*, 1993, Vol. 150, no. 5, pp. 1727-1734.
71. Streilein J.W. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, no. 11, pp. 879-889.
72. Streilein J.W., Arancibia-Caracamo C., Osawa H. The role of minor histocompatibility alloantigens in penetrating keratoplasty. *Dev. Ophthalmol.*, 2003, Vol. 36, pp. 74-88.
73. Streilein J.W., Niederkorn J.Y. Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. *J. Exp. Med.*, 1981, Vol. 153, no. 5, pp. 1058-1067.
74. Stuart P.M., Yin X., Plambeck S., Pan F., Ferguson T.A. The role of Fas ligand as an effector molecule in corneal graft rejection. *Eur. J. Immunol.*, 2005, Vol. 35, no. 9, pp. 2591-2597.
75. Sugita S., Usui Y., Horie S., Futagami Y., Yamada Y., Ma J., Kezuka T., Hamada H., Usui T., Mochizuki M., Yamagami S. Human corneal endothelial cells expressing programmed death-ligand 1 (PD-L1) suppress PD-1⁺ T helper 1 cells by a contact-dependent mechanism. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009, Vol. 50, no. 1, pp. 263-272.
76. Tahvildari M., Omoto M., Chen Y., Emami-Naeini P., Inomata T., Dohlman T.H., Kaye A.E., Chauhan S.K., Dana R. *In vivo* expansion of regulatory T cells by low-dose interleukin-2 treatment increases allograft survival in corneal transplantation. *Transplantation*, 2016, Vol. 100, no. 3, pp. 525-532.
77. Tan Y., Cruz-Guilloty F., Medina-Mendez C.A., Cutrufello N.J., Martinez R.E., Urbietta M., Wilson D., Li Y., Perez V.L. Immunological disruption of antiangiogenic signals by recruited allospecific T cells leads to corneal allograft rejection. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 12, pp. 5962-5969.
78. Taylor A.W. Ocular immune privilege. *Eye (Lond.)*, 2009, Vol. 23, no. 10, pp. 1885-1889.
79. The collaborative corneal transplantation studies (CCTS). Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Arch. Ophthalmol.*, 1992, Vol. 110, no. 10, pp. 1392-1403.
80. Turnquist H.R., Raimondi G., Zahorchak A.F., Fischer R.T., Wang Z., Thomson A.W. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4⁺ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3⁺ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 11, pp. 7018-7031.
81. Xie L., Shi W., Guo P. Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in corneal transplantation. *Transplantation*, 2003, Vol. 76, no. 11, pp. 1556-1559.
82. Yamada J., Hamuro J., Fukushima A., Ohteki T., Terai K., Iwakura Y., Yagita H., Kinoshita S. MHC-matched corneal allograft rejection in an IFN-gamma/IL-17-independent manner in C57BL/6 mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009, Vol. 50, no. 5, pp. 2139-2146.

83. Yamada J., Yoshida M., Taylor A.W., Streilein J.W. Mice with Th2-biased immune systems accept orthotopic corneal allografts placed in "high risk" eyes. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 162, no. 9, pp. 5247-5255.
84. Yamada J., Zhu S.N., Streilein J.W., Dana M.R. Interleukin-1 receptor antagonist therapy and induction of anterior chamber-associated immune deviation-type tolerance after corneal transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000, Vol. 41, no. 13, pp. 4203-4208.
85. Yamada Y., Sugita S., Horie S., Yamagami S., Mochizuki M. Mechanisms of immune suppression for CD8⁺ T cells by human corneal endothelial cells via membrane-bound TGF beta. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2010, Vol. 51, no. 5, pp. 2548-2557.
86. Yamagami S., Dana M.R., Tsuru T. Draining lymph nodes play an essential role in alloimmunity generated in response to high-risk corneal transplantation. *Cornea*, 2002, Vol. 21, no. 4, pp. 405-409.
87. Yamagami S., Hamrah P., Zhang Q., Liu Y., Huq S., Dana M.R. Early ocular chemokine gene expression and leukocyte infiltration after high-risk corneal transplantation. *Mol. Vis.*, 2005, Vol. 11, pp. 632-640.
88. Yan F., Cai L., Hui Y., Chen S., Meng H., Huang Z. Tolerogenic dendritic cells suppress murine corneal allograft rejection by modulating CD28/CTLA-4 expression on regulatory T cells. *Cell Biol. Int.*, 2014, Vol. 38, no. 7, pp. 835-848.
89. Yang W., Li H., Chen P.W., Alizadeh H., He Y., Hogan R.N., Niederkorn J.Y. PD-L1 expression on human ocular cells and its possible role in regulating immune-mediated ocular inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009, Vol. 50, no. 1, pp. 273-280.
90. Zhang X., Li M., Lian D., Zheng X., Zhang Z.X., Ichim T.E., Xia X., Huang X., Vladau C., Suzuki M., Garcia B., Jevnikar A.M., Min W.P. Generation of therapeutic dendritic cells and regulatory T cells for preventing allogeneic cardiac graft rejection. *Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 127, no. 3, pp. 313-321.
91. Zhou X., Bailey-Bucktrout S.L., Jeker L.T., Penaranda C., Martinez-Llordella M., Ashby M., Nakayama M., Rosenthal W., Bluestone J.A. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells *in vivo*. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, no. 9, pp. 1000-1007.

Авторы:

Нероев В.В. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Балацкая Н.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ченцова Е.В. — д.м.н., профессор, руководитель отдела травматологии и реконструктивной хирургии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Шамхалова Х.М. — аспирант отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Neroev V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Balatskaya N.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Head, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Chentsova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Traumatology and Reconstructive Surgery, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Shamkhalova Kh.M., Postgraduate Student, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Поступила 22.05.2019

Отправлена на доработку 24.05.2019

Принята к печати 14.11.2019

Received 22.05.2019

Revision received 24.05.2019

Accepted 14.11.2019

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИЗМЕНЯЕТСЯ В ЭМОЦИОГЕННЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ И ПРИ ОТМЕНЕ ЭТАНОЛА

Айрапетов М.И.^{1,2}, Ереско С.О.³, Бычков Е.Р.¹, Лебедев А.А.¹,
Шабанов П.Д.^{1,4}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Исследования последних лет предоставили убедительные доказательства того, что длительное употребление этанола приводит к активации механизмов нейроиммунной сигнализации. В последнее время большое внимание исследователей направлено на изучение toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLRs), которые играют одну из ключевых ролей в механизмах активации врожденной иммунной системы в структурах головного мозга в последствии употребления алкоголя. Известно, что активация TLRs приводит к высвобождению многих провоспалительных цитокинов с вытекающим отсюда нейровоспалительным процессом. Имеются предположения, что TLRs могут быть вовлечены и в модуляцию нейромедиаторных систем головного мозга, внося тем самым свой вклад в формирование патологической зависимости к этанолу. Цель нашей работы заключалась в исследовании уровня экспрессии генов TLRs (TLR3, TLR4, TLR7) и генов провоспалительных цитокинов (IL-1 β , CCL2) в различных структурах мозга крыс (миндалевидное тело, гиппокамп, медиальная энторинальная кора, стриатум) в условиях длительной алкоголизации и на разных сроках отмены этанола, что ранее исследователями не изучалось.

Длительная алкоголизация крыс этанолом не привела к изменениям уровней мРНК TLRs в исследуемых структурах головного мозга крыс, за исключением повышения уровня мРНК TLR3 в гиппокампе длительно алкоголизованных крыс и небольшого увеличения уровня мРНК TLR3 в mEC. Однако экспрессия генов TLRs подвергается изменениям во всех исследуемых нами структурах головного мозга крыс на разных сроках отмены алкоголя. При этом особого внимания заслуживает повышенный уровень экспрессии как TLRs, так и провоспалительных генов в период отмены алкоголя в гиппокампе мозга крыс, что свидетельствует о наличии стойкого нейровоспалительного процесса в данной структуре мозга в период отмены алкоголя, которая, вероятно, поддерживается при участии TLR-зависимой сигнализации. Изучение механизмов активации воспалительного процесса посредством TLR-зависимой сигнализации в различных структурах мозга может открыть новые мишени с целью воздействия на них лекарственными препаратами. Такие лекарственные средства могут быть использованы в комплексной терапии алкоголизма.

Ключевые слова: мозг, гиппокамп, алкоголизм, отмена алкоголя, Toll-подобные рецепторы, нейровоспаление

Адрес для переписки:

Айрапетов Марат Игоревич
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-68.
E-mail: interleukin1b@gmail.com

Address for correspondence:

Airapetov Marat I.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-68-68.
E-mail: interleukin1b@gmail.com

Образец цитирования:

М.И. Айрапетов, С.О. Ереско, Е.Р. Бычков,
А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов «Уровень экспрессии
Toll-подобных рецепторов изменяется в эмоциогенных
структурах мозга крыс в условиях длительной
алкоголизации и при отмене этанола» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 77-86.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-1836
© Айрапетов М.И. и соавт., 2020

For citation:

M.I. Airapetov, S.O. Eresko, E.R. Bychkov, A.A. Lebedev,
P.D. Shabanov "Expression of Toll-like receptors in
emotogenic structures of rat brain is changed under long-
term alcohol consumption and ethanol withdrawal", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 1, pp. 77-86.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-1836
DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-1836

EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN EMOTIOGENIC STRUCTURES OF RAT BRAIN IS CHANGED UNDER LONG-TERM ALCOHOL CONSUMPTION AND ETHANOL WITHDRAWAL

Airapetov M.I.^{a, b}, Eresko S.O.^c, Bychkov E.R.^a, Lebedev A.A.^a, Shabanov P.D.^{a, d}

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

^b St. Petersburg State Medical Pediatric University, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg State University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg, Russian Federation

^d S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Recent studies have provided strong evidence that long-term ethanol consumption leads to activation of the mechanisms of neuroimmune signaling. Recently, much attention has been focused on the study of toll-like receptors (Toll-like receptors, TLRs), which play one of the key roles in the mechanisms of activation of the innate immune system in brain structures subsequently ethanol consumption. It is known that the activation of TLRs leads to the release of many proinflammatory cytokines with the resulting neuroinflammatory process. There are suggestions that TLRs may also be involved in the modulation of neurotransmitter systems of the brain, thereby contributing to the formation of pathological dependence on ethanol. The goal of our work was to study the level of expression of the genes of TLRs (TLR3, TLR4, TLR7) and pro-inflammatory cytokine genes (IL-1 β , CCL2) in the rat brain (amygdala, hippocampus, medial entorhinal cortex, striatum) under conditions of prolonged alcoholization and on different periods of alcohol withdrawal, which was previously not studied by researchers. Prolonged alcoholization of rats with ethanol did not lead to changes in levels of mRNA of TLRs in the studied structures of the rat brain, with the exception of a small increase in the level of TLR3 mRNA in the hippocampus of prolonged alcoholized rats and a slight increase in the level of TLR3 mRNA in mEC. However, gene expression of TLRs undergoes changes in all the structures of the rat brain studied by us at different periods of alcohol withdrawal. The increased level of expression of both TLRs and proinflammatory genes in the period of alcohol withdrawal in the rat brain hippocampus deserves special attention, which indicates the presence of a persistent neuroinflammatory process in this brain structure in the period of alcohol withdrawal, which is probably supported with the participation of TLR-dependent signaling. The study of the mechanisms of inflammatory process activation by TLR-dependent signaling in different brain structures can open new targets for drug exposure. Such drugs can be used in the treatment of alcoholism.

Keywords: brain, hippocampus, alcoholism, alcohol withdrawal, Toll-like receptors, neuroinflammation

Введение

Алкоголизм представляет собой большую социально значимую проблему во всем мире. На данный момент имеются убедительные доказательства того, что длительное употребление алкоголя приводит к множественным изменениям механизмов нейротрансмиссии в головном мозге, что приводит к развитию алкоголизма [1, 2, 3, 4, 7, 19]. В последнее время все большее внимание исследователей привлекают изменения нейроиммунных механизмов, возникающих в мозге при длительной алкоголизации [2, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 20]. В экспериментах на грызунах и при исследовании посмертных образцов мозга людей, страдающих алкоголизмом, было показано, что этанол повышает уровень экспрессии TLR3, TLR4 и TLR7 (Toll-like receptor, TLR, Toll-подобные рецепторы) [13, 15, 16]. В головном мозге TLR4 расположен на поверхности цитоплазматической мембраны клеток микроглии,

тогда как TLR3 и TLR7 являются внутриклеточными рецепторами и локализованы на мембранах эндосом клеток микроглии. Имеются сведения и том, что некоторые подтипы TLRs могут быть локализованы и на других типах клеток микроглии [15]. Активация TLRs служит сигналом для запуска сложных внутриклеточных каскадов реакций, которые приводят к повышению уровня экспрессии многих генов врожденной иммунной системы (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN α , IFN β , MCP-1, CCL2, CXCL10 и др.) [2, 15, 16], что служит основой для развития нейровоспалительного процесса в головном мозге, результатом чего является повышенный уровень нейротоксичности с последующей гибелью нейронов и клеток микроглии [8, 9]. Помимо вовлеченности TLRs в развитие нейротоксического эффекта в ЦНС, предполагается, что они вносят свой вклад и в дисрегуляцию нейромедиаторных систем [20]. Поэтому представляется интересным изучить, как изменяется уровень экспрессии TLRs в раз-

личных структурах мозга, которые в первую очередь подвержены изменениям в ходе длительной алкоголизации. **Цель данной работы** — оценить уровень экспрессии TLR3, TLR4, TLR7, а также генов противовоспалительных цитокинов IL-1 β и CCL2 в период длительной алкоголизации и на разных сроках отмены алкоголя в следующих структурах головного мозга крыс: гиппокамп, миндалевидное тело, медиальная энторинальная кора (mEC, medial entorhinal cortex) и стриатум. Выбранные для исследования структуры мозга подвержены изменениям в первую очередь в условиях длительной алкоголизации. Предполагается, что данные подтипы TLRs вносят свой вклад в развитие нейровоспалительного процесса в данных структурах головного мозга.

Материалы и методы

Длительная алкоголизация

В работе были использованы 42 крысы-самца линии Вистар, полученные из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область), с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества № 86/609 ЕС), одобренных этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (выписка из протокола заседания локального этического комитета при ФГБНУ «ИЭМ» №2/15). В экспериментах с длительной алкоголизацией половозрелых крыс (начальный возраст 3–4 месяца) подвергали полунасильственной алкоголизации 20%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 1 месяца. Контрольная группа крыс в качестве источника жидкости получала воду.

Отмена этанола

Отмена длительной алкоголизации проводилась через 1 мес. алкоголизации. Крыс декапитировали на 1-е (n = 8), 7-е (n = 8) и 14-е (n = 8) сут. отмены алкоголя и производили забор биоматериала.

Забор биоматериала

Образцы необходимых структур мозга (гиппокамп, стриатум, миндалевидное тело, медиальная энторинальная кора) выделялись на холоде. Границы структур мозга были определены в соответствии с атласом мозга [17]. Выделенные структуры мозга немедленно замораживали в жидком

азоте и хранили при температуре -80 °C до проведения этапа гомогенизации и выделения тотальной РНК.

Реал-тайм ПЦР

Выделение тотальной РНК проводили из 20 мг пробы мозга с использованием реагента TRIzol (Ambion, США) в полном соответствии с инструкцией производителя. Обработку проб ДНКазой проводили с использованием ДНКазы (Promega, США) в полном соответствии с инструкцией производителя. После обработки ДНКазой концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P330 (Implen, Германия), по отношению A260/A280 (в норме $\geq 1,9$) оценивали чистоту выделенного продукта. Синтез кДНК проводили методом ОТ в 25 мкл реакционной смеси с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса лейкемии мышей Молони (M-MuLV обратной транскриптазы, Promega, США). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени (Mx3005P, Stratagene, США) проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green («Евроген», Россия), смесь специфических прямых и обратных праймеров (табл. 1), синтезированных в компании Beagle (Россия). Последовательность праймеров подбирали с рассчитанной температурой отжига 55 °C в программе Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Амплификацию для всех пар праймеров проводили по программе: начальная денатурация 95 °C, 5 мин; затем 40 циклов — 95 °C, 20 с; 55 °C, 20 с; 72 °C, 35 с. Затем для ПЦР-продуктов строили «кривую плавления» от 55 до 95 °C. Полученные данные нормировались к уровню гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Gapdh) и рассчитывались в относительных единицах по отношению к содержанию мРНК изучаемого гена методом 2 $\Delta\Delta$ CT.

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки полученных данных использовалась программа Graph Pad Prism v. 6. В качестве статистических критериев использовали традиционные показатели описательной статистики: среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение. Для сравне-

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРАЙМЕРОВ

TABLE 1. PRIMER SEQUENCE

Ген Gene	Праймеры Primers	
	Прямой (5'-3') Right (5'-3')	Обратный (5'-3') Reverse (5'-3')
Gapdh	CGGAGACGAATGGAATTAG	AAATCCGTTACACCGAC
TLR3	AACCTGGAGAACCTCCAAGA	CACCCTGGAGAAAACCTCTTT
TLR4	ACTCTGATCATGGCATTGTT	GTCTCAATTTACACCTGGA
TLR7	TGAAAATGGTATTTCCAATGTG	TAAGGGTAAGGTTGGTGGTA
IL-1 β	TGATGTTCCCATTAGACAGC	GAGAATACCACTTGTTGGCT
CCL2	AAGATGATCCCAATGAGTCG	TGGTGACAAATACTACAGCTT

ния групп использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Распределение отвечало критерию нормальности (критерий Колмогорова—Смирнова). Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$. Корреляционный анализ также был выполнен в программе Graph Pad Prism v. 6. Уровень взаимосвязи между двумя сравниваемыми переменными определяли по коэффициенту детерминации (R^2) [6].

Результаты

Уровень мРНК TLR3 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя

В условиях длительной алкоголизации в гиппокампе и mEC уровень мРНК TLR3 повышен по отношению к группе контроля, в стриатуме и миндалевидном теле изменений не выявлено. В период отмены алкоголя в гиппокампе уровень мРНК TLR3 повышен на всех сроках отмены; в миндалевидном теле уровень мРНК повышен на 1-е сут., на 7-е сут. показатель достигает уровня контроля, на 14-е сут. показатель снижается ниже уровня контрольных значений; в стриатуме показатель снижается на 1-е сут. и повышается на 7-е и 14-е сут. отмены; в mEC уровень мРНК TLR3 снижается на 1-е сут., на 7-е и 14-е сут. увеличивается, превысив уровень контрольных значений на 14-е сут. отмены алкоголизации (рис. 1).

Уровень мРНК TLR4 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя

Уровень мРНК TLR4 не имел статистически достоверных изменений ни в одной из исследуе-

мых структур головного мозга в группе длительной алкоголизации. В период отмены алкоголя в гиппокампе наблюдается пониженный уровень мРНК TLR4 только на 7-е сут. отмены алкоголя; в миндалевидном теле показатель повышается на 1-е сут. по отношению к группе длительной алкоголизации, на 7-е сут. снижается, достигнув уровня контрольных значений; на 14-е сут. уровень мРНК приобрел значение ниже уровня контрольных значений; в стриатуме уровень мРНК TLR4 повышается на 1-е и 7-е сут. отмены алкоголя, на 14 сут. уровень мРНК TLR4 в стриатуме мозга крыс снижается, достигая уровня контрольных значений; в mEC показатель повышен на 1-е сут. отмены, на 7-е сут. снижается, достигнув уровня контрольных значений и на 14-е сут. уровень мРНК приобрел значение ниже уровня контрольных значений (рис. 2).

Уровень мРНК TLR7 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя

Уровень мРНК TLR7 не изменяется ни в одной из исследуемых групп в группе длительной алкоголизации. В период отмены алкоголя в гиппокампе уровень мРНК TLR7 повышен на всех сроках отмены; в миндалевидном теле уровень мРНК увеличивается на 1-е сут. отмены, далее на 7-сут. и 14-е сут. снижается, приобретая значение уровня мРНК ниже уровня контроля; в стриатуме показатель понижен на всех сроках отмены алкоголя; в mEC не наблюдается изменений на уровне мРНК на протяжении всего эксперимента (рис. 3)

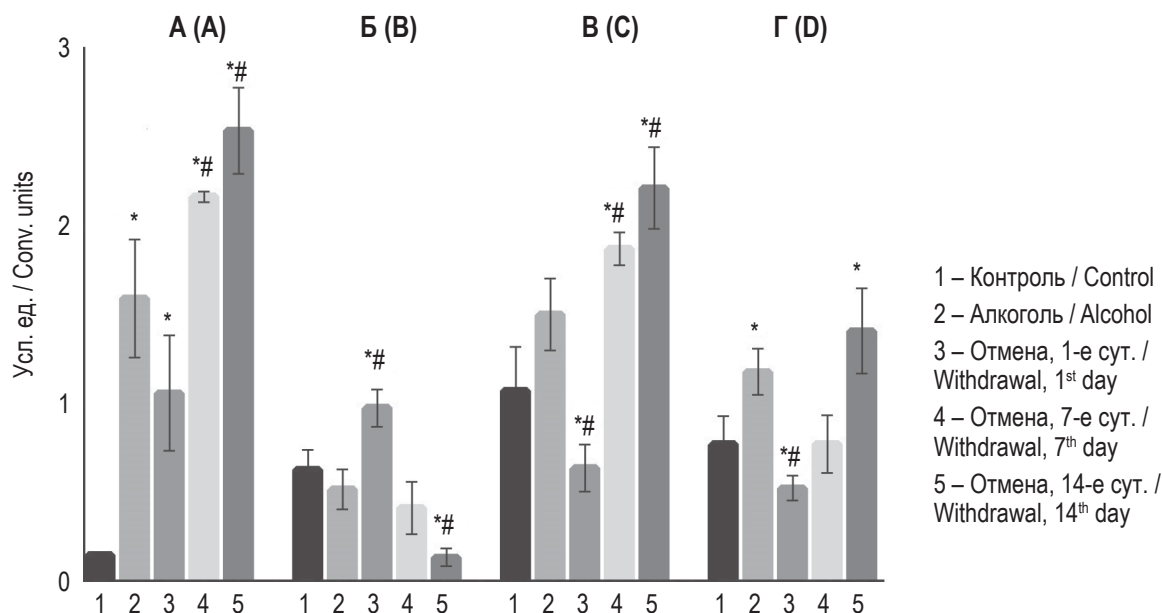


Рисунок 1. Уровень мРНК TLR3 в гиппокампе (А), миндалевидном теле (Б), стриатуме (В), mEC (Г) мозга крыс

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к группе контроля; # – $p < 0,05$ по отношению к группе алкоголизации.

Figure 1. Levels of mRNA of TLR3 in the hippocampus (A), the amygdala (B), the striatum (C), the mEC (D) of the rat brain

Note. *, $p < 0.05$ relative to the control group; #, $p < 0.05$ relative to the alcoholization group.

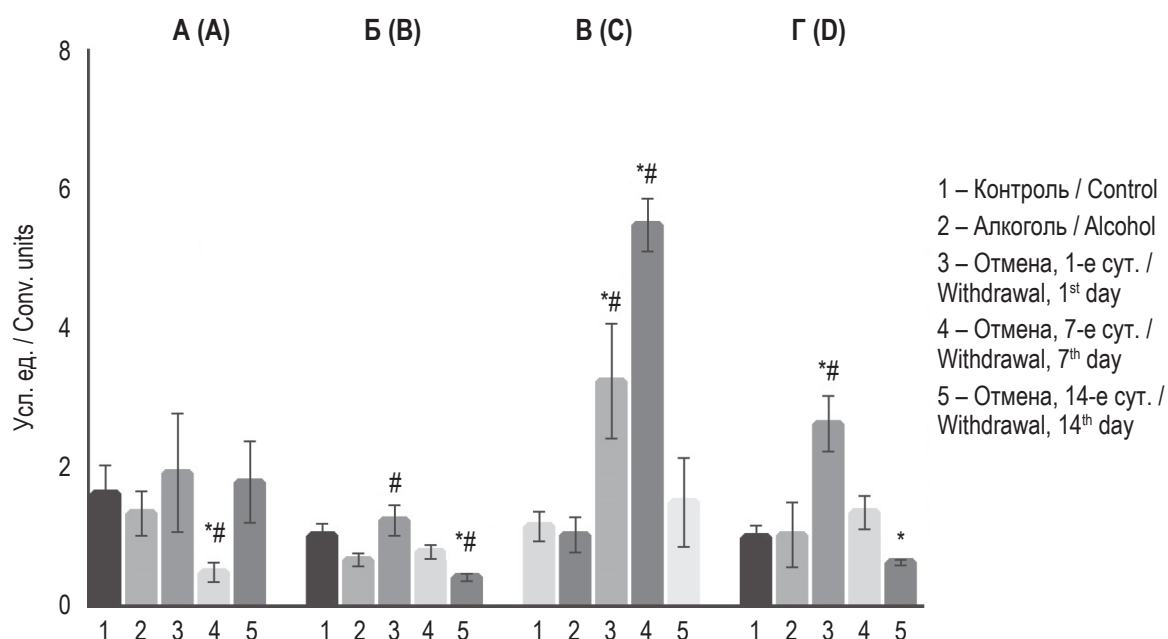


Рисунок 2. Уровень мРНК TLR4 в гиппокампе (А), миндалевидном теле (Б), стриатуме (В), мЕС (Г) мозга крыс
Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Levels of mRNA of TLR4 in the hippocampus (A), the amygdala (B), the striatum (C), the mEC (D) of the rat brain
Note. As for Figure 1.

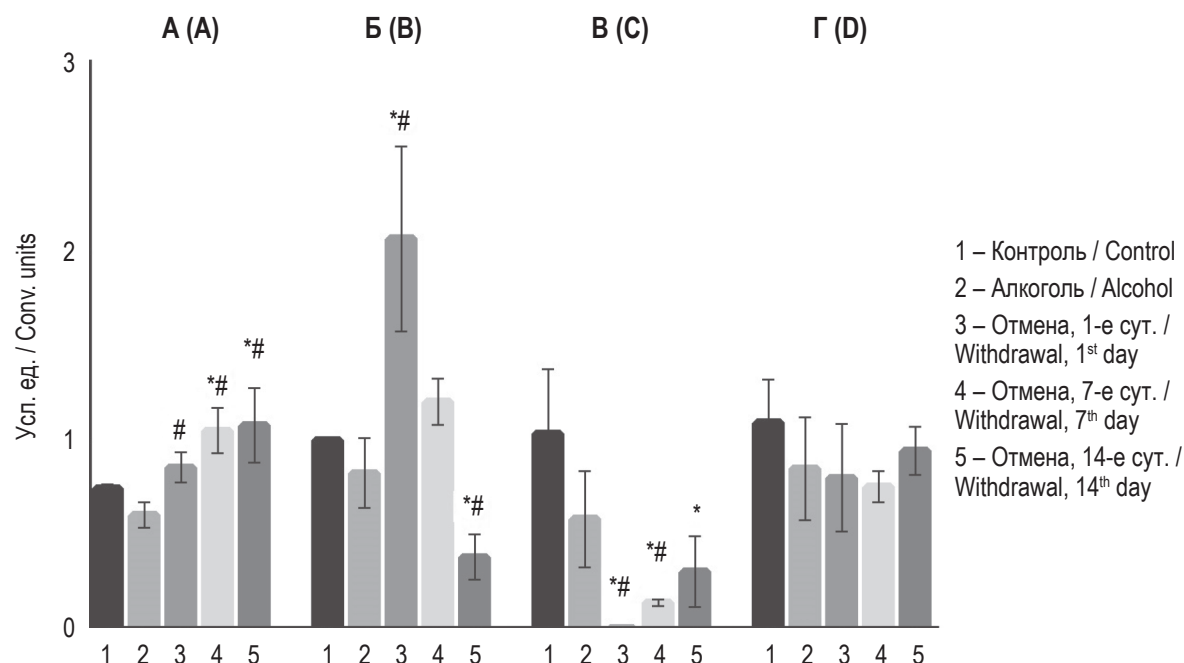


Рисунок 3. Уровень мРНК TLR7 в гиппокампе (А), миндалевидном теле (Б), стриатуме (В), мЕС (Г) мозга крыс
Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Levels of mRNA of TLR7 in the hippocampus (A), the amygdala (B), the striatum (C), the mEC (D) of the rat brain
Note. As for Figure 1.

Уровень мРНК провоспалительных цитокинов в условиях алкоголизации и при отмене алкоголя

Уровень мРНК IL-1 β в условиях длительной алкоголизации не изменяется в гиппокампе, повышен в миндалевидном теле и mEC. В период отмены алкоголя в гиппокампе уровень мРНК понижен на 7-е сут. и повышается на 14-е сут. В миндалевидном теле мозга крыс уровень мРНК повышен на 1-е сут. по отношению к группе контроля и понижается на 7-е и 14-е сут. отмены алкоголя по отношению к группе алкоголизации. В mEC наблюдается повышенный уровень мРНК IL-1 β в группах отмены алкоголя на 1-е и 7-е сут., однако на 14-е сут. отмены уровень мРНК IL-1 β достигает вновь уровня контрольных значений (рис. 4).

Уровень мРНК CCL2 в условиях длительной алкоголизации повышается в гиппокампе мозга крыс и не изменяется в миндалевидном теле и mEC. В период отмены алкоголя в гиппокампе показатель повышен на 1-е и 7-е сут., на 14-е сут. достигает уровня контрольных значений; в миндалевидном теле небольшое снижение на 1-е сут., на 7-е и 14-е сут. изменений не обнаружено, в mEC отмечается лишь небольшое снижение на 7-е сут. отмены (рис. 5).

Обсуждение

Уровень мРНК TLR3 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя

В экспериментах на мышах показано, что TLR3-сигнализация вовлечена в развитие про-

воспалительного ответа при употреблении алкоголя, а также опосредует механизмы патологического влечения к алкоголю и, следовательно, повышению уровня его потребления [20]. Однако данных совсем немного, чтобы можно было сделать полноценные выводы о вкладе TLR3 в патогенез алкоголизма. Совсем нет работ, которые бы показывали, что происходит с экспрессией гена TLR3 в лимбических структурах мозга, таких как гиппокамп и миндалевидное тело. Отсутствуют данные и об изменении экспрессии гена TLR3 в головном мозге в период отмены алкоголя на разных сроках после длительной алкоголизации. Мы получили, что уровень мРНК TLR3 в условиях алкоголизации изменяется только в гиппокампе мозга крыс, однако в период отмены алкоголя наблюдаются изменения в экспрессии гена TLR3 на уровне мРНК во всех исследуемых нами структурах головного мозга. К 14-му дню отмены уровень мРНК ниже уровня контрольных значений в миндалевидном теле (в 4,6 раза), выше уровня контрольных значений в гиппокампе (в 15,5 раз) и в стриатуме (в 2,1 раза), менее значительные изменения в медиальной энторинальной коре (выше уровня контроля в 1,9 раза) (рис. 1). Из литературных данных известно, что TLR3-зависимая сигнализация может оказывать влияние на уровень добровольного потребления алкоголя в эксперименте на грызунах [20]. Так, однократное введение внутрибрюшинно агониста TLR3 (поли (I:C)) мышам приводит к увеличению уровня добровольного потребления алкоголя в двухпоилочном тесте [20]. При ис-

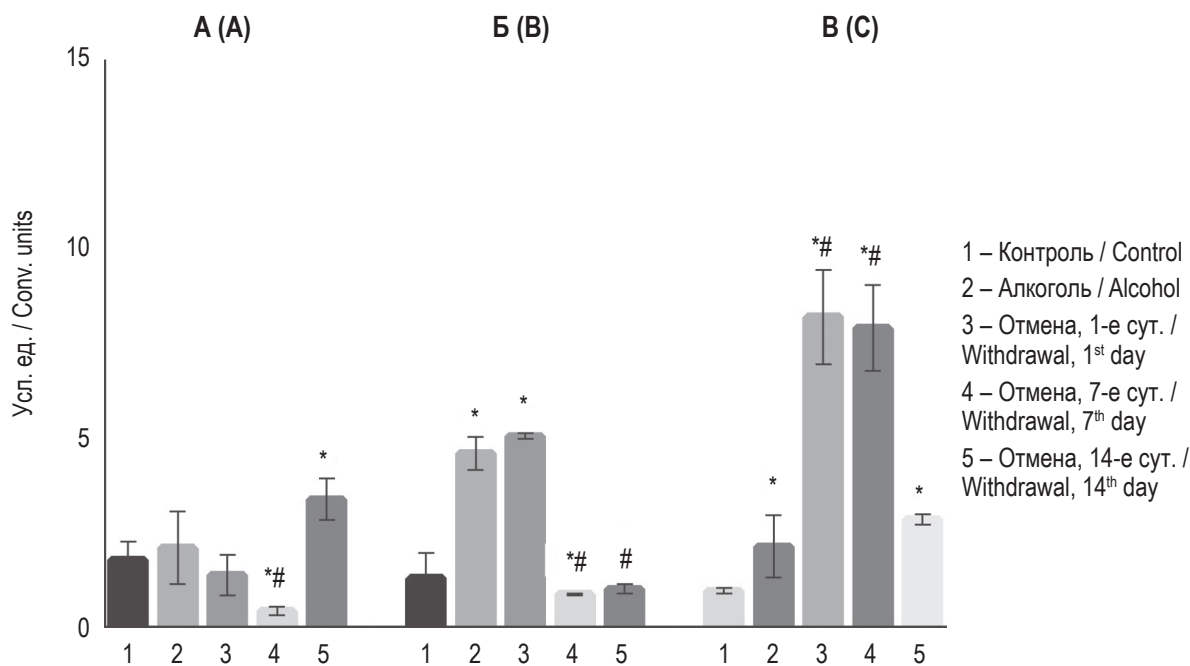


Рисунок 4. Уровень мРНК IL-1 β в гиппокампе (А), миндалевидном теле (Б), mEC (В) мозга крыс

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 4. Levels of mRNA of IL-1 β in the hippocampus (A), the amygdala (B), the mEC (C) of the rat brain

Note. As for Figure 1.

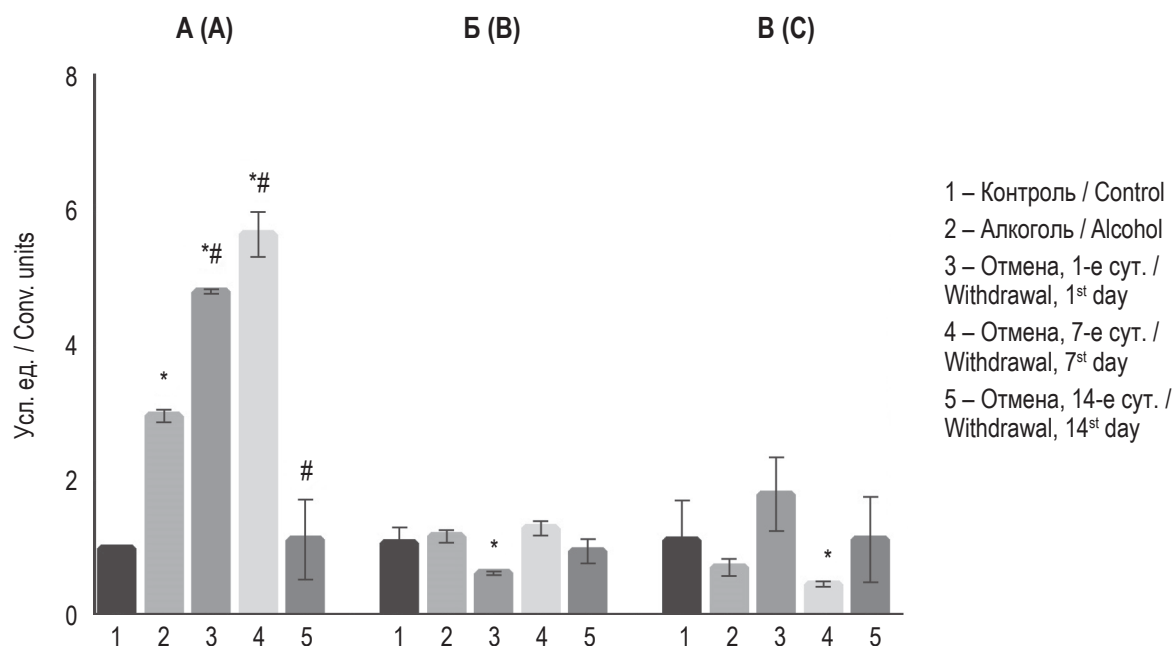


Рисунок 5. Уровень мРНК CCL2 в гиппокампе (А), миндалевидном теле (Б), мЕС (В) мозга крыс
Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 5. Levels of mRNA of CCL2 in the hippocampus (A), the amygdala (B), the mEC (C) of the rat brain
Note. As for Figure 1.

следовании последствия применения поли (I:C) на экспрессию генов в прилежащем ядре мозга крыс было показано, что активация TLR3 приводит к увеличению уровней мРНК TLR3, COX2 (cyclooxygenase 2, циклооксигеназа 2), а также и генов глутаматергической системы (mGluR2 – metabotropic glutamate receptor 2, метаботропный рецептор глутамата 2; mGluR3; GLT1 – glutamate transporter 1, глутаматный транспортер 1) и гена BDNF (brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический мозговой фактор) в прилежащем ядре мозга (NAcc, nucleus accumbens). Кроме того, увеличение мРНК каждого из этих генов коррелировало с увеличением уровня мРНК TLR3. Данные результаты свидетельствуют о том, что работа глутаматергической системы подвергается изменениям при активации TLR3 [18]. Исходя из полученных данных, мы предполагаем, что полученные изменения TLR3 на уровне мРНК в исследуемых структурах головного мозга в период отмены алкоголя могут быть связаны не только с вовлеченностью TLR3 в активацию экспрессии провоспалительных генов, но и в развитие механизмов, направленных по повышению уровня патологического влечения к алкоголю в период отмены алкоголя. Так что вполне возможно, что в изучаемых нами структурах роль TLR3 может связана с опосредованной их вовлеченностью в дисрегуляцию нейромедиаторных систем, что может и приводить, например, к мотивации употребить алкоголь в период его отмены. Для подтверждения полученных предположений необхо-

димо в дальнейшем проведение дополнительных исследований.

Уровень мРНК TLR4 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя

Наибольшее количество работ было направлено на изучение вовлеченности TLR4 в механизмы активации провоспалительного сигнала в результате потребления этанола, однако большинство таких работ выполнено на культурах клеток и на коре головного мозга мышей [8, 9, 20]. Мы же сосредоточили свое внимание на изучении уровня экспрессии гена TLR4 на уровне мРНК в таких структурах мозга крыс, как миндалевидное тело, медиальная энторинальная кора (мЕС), стриатум и гиппокамп. Результаты нашего эксперимента не показали существенных изменений в структурах длительно алкоголизированного мозга спустя 1 мес. алкоголизации. Однако в период отмены алкоголя уровень мРНК изменяется во всех исследуемых нами структурах головного мозга крыс. Так, к 14-му дню отмены уровень мРНК TLR4 снижается в миндалевидном теле (в 2,4 раза) и медиальной энторинальной коре (в 1,6 раза) ниже уровня контрольных значений, в стриатуме и гиппокампе возвращается до уровня контрольных значений (рис. 2). Большое количество выполненных исследований на крысах и мышах с применением генетических и фармакологических манипуляций (нокаут TLR4 и применение антагонистов) показали, что активность TLR4 не регулирует уровень потребления этанола, но, тем не менее, наблюдаются изменения в TLR4-опосредованном сигналинге

после употребления алкоголя [8, 9, 20]. Однако, несмотря на то, что TLR4 непосредственно не вовлечен в формирование патологического влечения к алкоголю, он участвует в процессах активации провоспалительных генов, результатом чего служит развитие нейровоспалительного процесса в ЦНС. Также имеются предположения о том, что TLR4-MyD88-зависимый сигналинг может изменять активность ГАМК-ергической трансмиссии в ЦНС [8], что указывает и на иные физиологические роли TLR4, отличающиеся от активации генов врожденной иммунной системы. Имеются данные и о том, что TLR4 образует гетеродимеры с рецептором кортиколиберина второго типа (CRFR2) в ЦНС [5]. Введение внутривентрикулярно LPS (lipopolysaccharide, липополисахарида), экзогенного лиганда TLR4, ускоряет развитие тревожного поведения у животных, впоследствии подвергающихся воздействию этанола [16]. Мыши, лишенные TLR4 или MyD88, становились менее чувствительными к седативным и опьяняющим эффектам от этанола, тогда как мыши, лишенные TLR2, не отличались от контрольных мышей в этих тестах [8]. Все это указывает на то, что TLR4 может опосредованно изменять активность нейромедиаторных систем, что может также вносить свой вклад в патогенез алкоголизма.

Уровень мРНК TLR7 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя

Помимо уже описанных TLR3 и TLR4, небольшое количество исследований было направлено на изучение вклада TLR7 в патогенез алкоголизма [11]. При этом уровень экспрессии гена TLR7 в различных структурах мозга ранее не изучался. В нашем эксперименте мы получили, что уровень мРНК TLR7 в длительно алкоголизированном мозге не изменяется ни в одной из исследуемых структур головного мозга. В период отмены алкоголя к 14-дню отмены уровень мРНК TLR7 был понижен в миндалевидном теле (в 3,2 раза) и стриатуме (в 3,5 раза), повышен в гиппокампе (в 8,5 раз), в медиальной энторинальной коре изменений на уровне мРНК не выявлено (рис. 3). Относительно полученных изменений на уровне мРНК сложно сделать какие-либо существенные выводы, так как работ, уделяющих внимание TLR7-зависимой сигнализации в головном мозге, не так много.

Уровень мРНК провоспалительных цитокинов в условиях алкоголизации и при отмене алкоголя

Высокий уровень мРНК провоспалительных цитокинов может свидетельствовать о наличии нейровоспалительного процесса в головном мозге крыс [10, 11, 12, 15, 16]. В нашем эксперименте уровень мРНК IL-1 β повышен в миндалевидном теле (в 2,5 раза) и в mEC (в 2,2 раза), в гиппокампе отмечается небольшое снижение (в 1,6 раза). В период отмены алкоголя к 14-дню отмены уровень мРНК IL-1 β приходит к норме, достигнув

уровня контрольных значений, в миндалевидном теле и в mEC, однако в гиппокампе уровень мРНК IL-1 β к 14-дню отмены превышает уровень контроля в 13,6 раза (рис. 4). Уровень мРНК CCL2 незначительно изменяется в условиях алкоголизации, к 14-му дню отмены этанола во всех исследуемых структурах мозга уровень мРНК находится на уровне контрольных значений. Однако стоит отметить то, что в гиппокампе на 7-е сут. отмены уровень мРНК CCL2 превышает уровень контроля в 9,1 раза (рис. 5). Хорошо известно, что цитокин CCL2 является важнейшим хемокином, который отвечает за миграцию моноцитов к очагу воспаления [5, 14]. Следовательно, повышенная экспрессия гена CCL2 на 7-е сут. отмены алкоголя свидетельствует о наличии нейровоспалительного процесса в гиппокампе, при этом уровень мРНК провоспалительного гена IL-1 β в гиппокампе также повышен в 4,3 раза на 7-е сут. отмены и в 13,6 раза к 14-му дню отмены. Все эти данные свидетельствуют о наличии длительного нейровоспалительного процесса в гиппокампе мозга крыс в период отмены алкоголя.

Корреляционный анализ

Задача заключалась в попытке выявить вклад разных подтипов TLRs (TLR3, TLR4, TLR7) в активацию выбранных нами генов врожденной иммунной системы (IL-1 β и CCL2) в исследуемых нами структурах головного мозга крыс. Корреляционный анализ показал взаимосвязь между динамикой изменчивости уровней мРНК провоспалительных цитокинов и TLRs в исследуемых нами структурах головного мозга крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя. Так, были получены данные о том, что уровень мРНК TLR3 коррелирует с уровнем мРНК IL-1 β в гиппокампе мозга крыс ($R^2 = 0,872$). Полученная корреляция может указать на вовлеченность TLR3-зависимой сигнализации в повышении экспрессии гена провоспалительного цитокина IL-1 β в гиппокампе мозга крыс. В других же структурах мозга (стриатум, миндалевидное тело, mEC) уровень мРНК TLR3 не коррелирует с уровнем мРНК IL-1 β , что может указывать нам на то, что активация TLR3-зависимой сигнализации в других структурах мозга может приводить к развитию иных событий на уровне внутриклеточной сигнализации. К примеру, известно, что TLR3-зависимая сигнализация, наряду с TLR4-зависимой сигнализацией, может приводить к активации транскрипционных факторов интерферонов (IRF3), что в дальнейшем приводит уже к повышенной экспрессии генов интерферонов [5]. Далее корреляционный анализ показал нам, что уровень мРНК TLR4 коррелирует с уровнем мРНК провоспалительного цитокина IL-1 β в гиппокампе ($R^2 = 0,872$) и в mEC ($R^2 = 0,872$). На основе данной корреляции также можем сделать вывод, что TLR4-зависимая сигнализация, вероятно, также вовлечена в активацию экспрес-

сии провоспалительного гена IL-1 β в mEC и гиппокампе. Ранее исследователями было показано, что активация TLR4 приводит к повышению активности уровня не только IL-1 β , но и CCL2 [13, 14, 15]. Однако в нашем эксперименте уровень мРНК TLR4 не коррелирует ни в одной из структур мозга с уровнем цитокина CCL2. Полученный результат может объясняться выбранной нами иной методикой алкоголизации или отобранными экспериментальными группами для исследования уровня мРНК. Также возможно, что в исследуемых нами структурах мозга активация TLR4 не приводит к активации гена провоспалительного цитокина CCL2, но приводит в других, как это было показано ранее, например в префронтальной коре мозга в эксперименте на мышах [16]. Наблюдаемые изменения активности гена TLR4 на уровне мРНК в других структурах мозга, где уровень мРНК не коррелирует с IL-1 β , может объясняться тем, что TLR4-зависимая сигнализация в миндалевидном теле и стриатуме, возможно, приводит к активации иных провоспалительных генов. Известно, что как TLR4, так и TLR3 способны активировать транскрипционные факторы интерферонов (IRF3), что приводит к повышению экспрессии генов интерферонов [5]. Уровень мРНК TLR7 коррелирует с уровнем мРНК IL-1 β в гиппокампе мозга крыс ($R^2 = 0,872$), что может также указывать на вовле-

ченность TLR7-зависимой сигнализации в активацию провоспалительных генов в данной структуре мозга. В других же структурах мозга на уровне мРНК TLR7 не наблюдается такой корреляции, что указывает на то, что TLR7-зависимая сигнализация в других структурах мозга может играть иную роль.

Выводы

Исследование показало, что экспрессия Toll-подобных рецепторов подвергается изменениям в результате потребления алкоголя во всех исследуемых нами структурах головного мозга крыс в период отмены алкоголя. При этом особого внимания заслуживает повышенный уровень экспрессии как TLRs, так и провоспалительных генов в период отмены алкоголя в гиппокампе мозга крыс, что свидетельствует о наличии стойкого нейровоспалительного процесса в данной структуре мозга в период отмены алкоголя, которая, вероятно, поддерживается при участии TLR-зависимой сигнализации. Изучение механизмов активации нейровоспалительного процесса посредством TLR-зависимой сигнализации в различных структурах мозга может открыть новые мишени с целью воздействия на них лекарственными препаратами [2, 15]. Такие лекарственные средства могут быть использованы в комплексной терапии алкоголизма.

Список литературы / References

1. Айрапетов М.И., Сексте Э.А., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. Хроническая алкоголизация приводит к изменению уровня мРНК рецептора орексина первого типа (OX1R) в эмоциогенных структурах мозга крыс // Биомедицинская химия, 2018. Т. 64, № 5. С. 451-454. [Airapetov M.I., Sekste E.A., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. Chronic alcoholism leads to a change in the level of mRNA of the receptor of the first type of orexin (OX1R) in emotiogenic structures of the brain of rats. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2018, Vol. 64, no. 5, pp. 451-454. (In Russ.)]
2. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Сексте Э.А., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. Употребление алкоголя приводит к активации нейроиммунной системы посредством белка HMGB1 // Наркология, 2019. Т. 18, № 5. С. 96-102. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Sekste E.A., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Shabanov P.D. The use of alcohol leads to activation of the neuroimmune system via protein HMGB1. *Narkologiya = Narcology*, 2019, Vol. 18, no. 5, pp. 96-102. (In Russ.)]
3. Айрапетов М.И., Хохлов П.П., Бычков Е.Р., Сексте Э.А., Якушина Н.Д., Лебедев А.А., Лавров Н.В., Шабанов П.Д. Влияние алкоголизации матерей на активность грелиновой системы в пренатальный и ранний постнатальный периоды развития у потомства крыс // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 2015. Т. 13, № 2. С. 10-13. [Airapetov M.I., Khokhlov P.P., Bychkov E.R., Sekste E.A., Yakushina N.D., Lebedev A.A., Lavrov N.V., Shabanov P.D. Influence of alcoholization of mothers on the activity of the grelin system in the prenatal and early postnatal periods of development in the offspring of rats. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii = Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2015, Vol. 13, no. 2, pp. 10-13. (In Russ.)]
4. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Сексте Э.А., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. Отмена хронической алкоголизации приводит к увеличению количества мРНК CRFR2 в вентральной тегментальной области мозга у крыс // Биомедицинская химия, 2019. Т. 65, № 5. С. 385-387. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Sekste E.A., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Shabanov P.D. Ethanol withdrawal leads to an increase in the CRFR2 mRNA level in the ventricular tegmental region of the rat brain. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2019, Vol. 65, no. 5, pp. 385-387. (In Russ.)]
5. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунология образраспознающих рецепторов. М.: Ленанд, 2017. 256 с. [Lebedev K.A., Ponyakina I.D. Immunology of image-recognizing receptors]. Moscow: Lenand, 2017. 256 p.
6. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 384 с. [Trukhacheva N.V. Mathematical statistics in biomedical research with the use of Statistica]. Moscow: GEOTAR-Media, 2012. 384 p.

7. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Стрельцов В.Ф. Гормональные механизмы подкрепления. СПб.: Элби-СПб, 2008. 272 с. [Shabanov P.D., Lebedev A.A., Streltsov V.F. Hormonal mechanisms of reinforcement]. St. Petersburg: Elby-Spb, 2008. 272 p.
8. Blednov Y.A., Black M., Benavidez J.M., da Costa A., Mayfield J., Harris R.A. Sedative and motor incoordination effects of ethanol in mice lacking CD14, TLR2, TLR4, or MyD88. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2017, Vol. 41, no. 3, pp. 531-540.
9. Blednov Y.A., Ponomarev I., Geil C., Bergeson S., Koob G.F., Harris R.A. Neuroimmune regulation of alcohol consumption: behavioral validation of genes obtained from genomic studies. *Addict. Biol.*, 2012, Vol. 17, pp. 108-120.
10. Coleman L.G., Crews F.T. Innate immune signaling and alcohol use disorders. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2018, Vol. 248, pp. 369-396.
11. Coleman L.G., Zou J., Crews F.T. Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7. *J. Neuroinflammation*, 2017, Vol. 14, no. 1, pp. 1-15.
12. Coleman L.G., Zou J., Qin L., Crews F.T. HMGB1/IL-1 β complexes regulate neuroimmune responses in alcoholism. *Brain Behav. Immun.*, 2018, Vol. 72, pp. 61-77.
13. Crews F.T., Vetreno R.P. Neuroimmune basis of alcoholic brain damage. *Int. Rev. Neurobiol.*, 2014, Vol. 118, pp. 315-357.
14. Crews F.T., Vetreno R.P. Mechanisms of neuroimmune gene induction I alcoholism. *Psychopharmacology*, 2016, Vol. 233, pp. 1543-1557.
15. Crews F.T., Walter T.J., Coleman L.G., Vetreno R.P. Toll-like receptor signaling and stages of addiction. *Psychopharmacology*, 2017, Vol. 234, no. 9-10, pp. 1483-1498.
16. Guerri C., Pascual M. Impact of neuroimmune activation induced by alcohol or drug abuse on adolescent brain development. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2019, Vol. 77, pp. 89-98.
17. Paxinos G., Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates: compact. 7th ed. 2017. 388 p.
18. Randall P.A., Vetreno R.P., Makhijani V.H., Crews F.T., Besheer J. The Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C) induces rapid and lasting changes in gene expression related to glutamatergic function and increases ethanol self-administration in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2018, Vol. 43, no. 1, pp. 48-60.
19. Shabanov P.D., Airapetov M.I., Sekste E.A., Khokhlov P.P., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Vinogradov P.M., Roik R.O., Pavlenko V.P. Serum unacylated ghrelin concentrations and expression of GHSR mRNA in the rat brain structures after chronic alcoholization and ethanol withdrawal. *Eur. Neuropsychopharmacology*, 2014, Vol. 24, Suppl. 2, p. 653.
20. Warden A.S., Azzam M., DaCosta A., Mason S., Blednov Y.A., Messing R.O., Harris R.A. Toll-like receptor 3 dynamics in female C57BL/6J mice: Regulation of alcohol intake. *Brain Behav. Immun.*, 2018, Vol. 77, pp. 66-76.

Авторы:

Айрапетов М.И. — к.м.н., доцент, отдел нейрофармакологии имени С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии и фармакоэкономики ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ереско С.О. — аспирант, мегафакультет биотехнологий и низкотемпературных систем ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», Санкт-Петербург, Россия

Бычков Е.Р. — к.м.н., заведующий лабораторией, отдел нейрофармакологии имени С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Лебедев А.А. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией, отдел нейрофармакологии имени С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Шабанов П.Д. — д.м.н., профессор, заведующий отделом нейрофармакологии имени С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; кафедра фармакологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Airapetov M.I., PhD (Medicine), Associate Professor, S. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine; Department of Pharmacology with a Course of Clinical Pharmacology and Pharmacoeconomics, St. Petersburg State Medical Pediatric University, St. Petersburg, Russian Federation

Eresko S.O., Postgraduate Student, Mega-faculty of Biotechnologies and Low-temperature Systems, St. Petersburg State University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg, Russian Federation

Bychkov E.E., PhD (Medicine), Head of Laboratory, S. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Lebedev A.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head of Laboratory, S. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Shabanov P.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, S. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine; S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 25.07.2019
Отправлена на доработку 27.09.2019
Принята к печати 03.12.2019

Received 25.07.2019
Revision received 27.09.2019
Accepted 03.12.2019

МОДЕЛИРОВАНИЕ СИНДРОМА СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ХИМИЧЕСКОЙ ИНДУКЦИЕЙ ТРАВМЫ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА У КРЫС

Борщев Ю.Ю.^{1,5}, Буровенко И.Ю.^{1,4}, Карасева А.Б.², Минасян С.М.^{1,9},
Борщев В.Ю.³, Семенова Н.Ю.¹, Борщева О.В.¹, Половинкин В.В.⁶,
Родионов Г.Г.⁷, Суворов А.Н.^{2,8}, Галагудза М.М.^{1,9}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Технический университет Молдовы, г. Кишинев, Республика Молдова

⁴ ГОУ «Приднестровский государственный университет имени Т.Г. Шевченко», г. Тирасполь, Республика Молдова

⁵ ООО «НИЦ Пробиокод СП», Москва, Россия

⁶ ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

⁷ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

⁸ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

⁹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель исследования — разработка модели синдрома системной воспалительной реакции (ССВР) химической индукцией травмы толстой кишки и антибиотик-ассоциированным дисбиозом кишечника у крыс с первичным висцеральным ожирением (ПВО) для исследований устойчивости миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению. Эксперименты были выполнены на взрослых крысах-самцах стока Wistar с ПВО в условиях улучшенного конвенционального вивария. Однократно химически индуцированное воспалительное заболевание толстой кишки (ХИВЗТК) сопровождалось внутрижелудочным введением смеси антимикробных препаратов широкого спектра действия (АМП) в течение 3-х дней. Через 5 дней проводили иммунологические и биохимические исследования, изучали состав кишечной микробиоты в фекалиях и короткоцепочечных жирных кислот в крови, морфологические изменения структуры толстой кишки, гемодинамические параметры и устойчивость миокарда на модернизированной установке по Лангендорфу. У крыс с ПВО на фоне жироклеточной диеты (ЖУД) существенно увеличилась масса депозитов висцерального жира и содержание липополисахаридов (LPS) в крови. У животных с ХИВЗТК, помимо LPS, произошло до-

Адрес для переписки:

Галагудза Михаил Михайлович
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ
197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2.
Тел.: 8 (812) 702-37-00.
E-mail: galagudza@almazovcentre.ru

Address for correspondence:

Galagudza Michael M.
V. Almazov National Medical Research Centre
197341, Russian Federation, St. Petersburg,
Akkuratova str., 2.
Phone: 7 (812) 702-37-00.
E-mail: galagudza@almazovcentre.ru

Образец цитирования:

Ю.Ю. Борщев, И.Ю. Буровенко, А.Б. Карасева, С.М. Минасян, В.Ю. Борщев, Н.Ю. Семенова, О.В. Борщева, В.В. Половинкин, Г.Г. Родионов, А.Н. Суворов, М.М. Галагудза «Моделирование синдрома системной воспалительной реакции химической индукцией травмы толстого кишечника у крыс» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 87-98. doi: 10.15789/1563-0625-MOS-1839

© Борщев Ю.Ю. и соавт., 2020

For citation:

Yu. Yu. Borshchev, I. Yu. Burovenko, A. B. Karaseva, S. M. Minasyan, V. Yu. Borshchev, N. Yu. Semenova, O. V. Borshcheva, V. V. Polovinkin, G. G. Rodionov, A. N. Suvorov, M. M. Galagudza "Modeling of systemic inflammatory response syndrome by chemical induction of colon injury in rats", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 87-98. doi: 10.15789/1563-0625-MOS-1839

DOI: 10.15789/1563-0625-MOS-1839

стоверное увеличение концентрации провоспалительных цитокинов (TNF, IL-8, MCP-1), а после перорального введения смеси АМП, показаны выраженные нарушения пищевого поведения и эвакуаторной функции желудочно-кишечного тракта, глубокие деструкционные изменения в толстой кишке, качественного и количественного состава кишечной микробиоты, характерные для дисбиоза 1-й степени, и только для IL-8 отмечен высокий уровень. Повышение концентрации уксусной и пропионовой кислоты в крови показано у животных с ХИВЗТК и в большей степени у крыс с антибиотик-индуцированным дисбиозом (АИД). ЖУД существенно снизило представительство лактобацилл и бифидобактерий в толстокишечном содержимом. Индуцирование ВЗК приводит к манифестированию кишечной палочки, а дисбиоза кишечника — протей. Коморбидное сочетание патологических изменений в иммунной и пищеварительной системах вызвало достоверное увеличение площади некроза миокарда изолированного сердца на 35%, то есть снижение устойчивости миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению (ИРП).

Модель ССВР, индуцированная химической травмой толстого кишечника, отягощается введением смеси АМП и характеризуется контролируемым изменением маркеров воспаления. Степень ухудшения морфофункциональных характеристик изолированного сердца, в том числе снижение устойчивости к ИРП, соответствует острому воспалительному заболеванию кишечника с индуцированным дисбиозом кишечника. Данная модель может быть использована в экспериментальной медицине в области кардиологии, эндомикроэкологии, гастроэнтерологии и иммунологии.

Ключевые слова: цитокины, воспалительное заболевание толстой кишки, антибиотик-индуцированный дисбиоз, изолированное сердце, размер инфаркта

MODELING OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME BY CHEMICAL INDUCTION OF COLON INJURY IN RATS

**Borshchev Yu.Yu.^{a,e}, Burovenko I.Yu.^{a,d}, Karaseva A.B.^b,
Minasyan S.M.^{a,i}, Borshchev V.Yu.^c, Semenova N.Yu.^a,
Borshcheva O.V.^a, Polovinkin V.V.^f, Rodionov G.G.^g,
Suvorov A.N.^{b,h}, Galagudza M.M.^{a,i}**

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

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

^c Technical University of Moldova, Kishinev, Republic of Moldova

^d T. Shevchenko Pridnestrovian State University, Tiraspol, Republic of Moldova

^e LLC "Research Center Probiocode SP", Moscow, Russian Federation

^f Research Institute — S. Ochapovsky Regional Clinical Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation

^g A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Abstract. Our objective was to develop a model of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) by chemical induction of colon injury and antibiotic-associated intestinal dysbiosis in rats with primary visceral obesity (PVO) for studies of myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury. The experiments were performed with adult Wistar male rats with PVO under improved conditions of a conventional animal clinic. The chemically induced inflammatory colon disease (CIICD) was accomplished by intragastric administration of a mixture of broad-spectrum antimicrobial agents (AMA) for 3 days. Five days later, immunological and biochemical studies were carried out, as follows: composition of the intestinal microbiota in feces and short-chain fatty acids in blood, morphological changes in the structure of the colon, hemodynamic parameters and myocardial stability with modified Langendorff system. In PVO rats, the mass of visceral fat deposits and the content of lipopolysaccharides (LPS) in the blood were significantly increased when giving them fat-carbohydrate diet (FCD). In animals with CIICD, in addition to LPS, there was a significant increase in pro-

inflammatory cytokine concentration (TNF, IL-8, MCP-1), and after oral administration of the AMA mixture, pronounced disturbances of food behavior and evacuatory function of gastrointestinal tract, deep destructive changes in colon, as well as qualitative and quantitative composition of intestinal microbiota with characteristics typical to the first-grade dysbiosis. High levels were shown for IL-8 cytokine only. An increase in acetic and propionic acid concentrations were shown in blood in animals with CIICD, and, to a greater extent, in rats with antibiotic-induced dysbiosis (AID). FCD was followed by significantly reduced levels of lactobacilli and bifidobacteria in colonic contents. CIICD leads to detection of *Escherichia coli*, and intestinal dysbiosis leads to the manifestation of *Proteus*. A comorbid combination of pathological changes in the immune and digestive systems caused a significant increase in the area of myocardial necrosis (by 35 percent) in isolated heart by, thus presuming decreased myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury (IRI). The SIRS model induced by chemical trauma to large intestine is aggravated by the introduction of AMAs mixture, and it is characterized by a controlled change in inflammatory markers. Deterioration of morphofunctional characteristics in isolated heart included decrease in resistance to IRI seems to correspond to acute inflammatory bowel disease with induced intestinal dysbiosis. This model can be used in experimental medicine in the field of cardiology, endomicroecology, gastroenterology, and immunology.

Keywords: cytokines, inflammatory colon disease, antibiotic-induced dysbiosis, isolated heart, infarct size

Работа выполнена в научно-исследовательском отделе токсикологии Центра доклинических трансляционных исследований Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» (Санкт-Петербург).

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-15-00153).

Введение

Системный воспалительный ответ обусловлен выделением и неконтролируемым распространением цитокинов и провоспалительных медиаторов из первичного очага воспаления в окружающие ткани, а затем и в систему кровотока. Ключевым понятием в клинической медицине, характеризующим ответную реакцию организма на любое инфекционное воспаление (инфицированная рана, ожог, перфорация полого органа брюшной полости, воспаление червеобразного отростка, пневмония, эндокардит и т. д.) является синдром системной воспалительной реакции — ССВР (SIRS) [17]. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) характеризуются наличием воспалительно-деструктивных процессов в кишечнике и рецидивирующим течением. ВЗК представлены язвенным колитом, болезнью Крона, а также более редкими заболеваниями — коллагенозным колитом, лимфоцитарным колитом и атипичным микроскопическим колитом, которые различаются этиопатогенетически, по локализации, макроскопической и гистологической картине [13]. Моделирование данной патологии индукцией воспаления ЖКТ различного генеза у животных широко используется в экспериментальной медицине [23]. Основные направления в экспериментальном моделировании ВЗК вклю-

чают использование генетически модифицированных лабораторных животных и различные методы химической индукции ЯК и БК путем экзогенного введения в пищеварительный тракт веществ — гаптенных иммунологических реакций: тринитробензолсульфоновой кислоты, динитробензолсульфоновой кислоты, декстран сульфата натрия, уксусной кислоты, оксазолона, каррагинана. Индукция ВЗК химическими веществами является приоритетной экспериментальной моделью в сравнении с использованием генетически конструированных линий лабораторных животных, в связи с экономическим преимуществом, доступностью методов, простотой в исполнении и быстрой реализацией модели [11]. Учитывая широкое использование антимикробных препаратов (АМП) в клинической и ветеринарной практике при лечении ВЗК, необходимо учитывать коморбидное влияние этих патологий и существенные изменения состава кишечной микробиоты, с развитием АИД [7] и воспалительных цитокинов [1], с их воздействием на морфофункциональные характеристики как иммунной и пищеварительной [19], так и сердечно-сосудистой системы [4].

Целью данного исследования была разработка адекватной модели ССВР вследствие воспалительного заболевания толстого кишечника, осложненного АИД, вызванного смесью АМП широкого спектра действия (амоксиклав, метронидазол, кларитромицин) для изучения устойчивости миокарда к ИРП у крыс с ПВО с исследованием гематологических, иммунологических, биохимических параметров крови и состава короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖ), микробиологического состава фекалий, гистологических характеристик кишечника, гемодинамических и морфофункциональных показателей

миокарда изолированного сердца, для последующей трансляции в клиническую практику.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на самцах крыс стока Wistar с улучшенным конвенциональным статусом, массой 320-350 г, в соответствии с Директивой Европейского Совета по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными. Животные случайным образом распределялись в одну из четырех групп ($n = 14$ в каждой группе): 1) контроль: крысы получали стандартный корм *ad libitum*, группа КТР; 2) крысы с первичным висцеральным ожирением, индуцированным ЖУД: в дополнение к стандартной диете животные получали ежедневно *per os* в течение 28 дней по 2 г гидрогенизированных жиров и 1 г сахара, группа ПВО; 3) моделирование ССВР: животным с ПВО одноразово ректально вводили 1 мл смеси 3% раствора уксусной кислоты и этанола, индуцируя острое воспаление толстого кишечника, группа ВТК; 4) антимикробная терапия смесью АМП (амоксциллин, метронидазол и кларитромицин): животным с ПВО и ВТК внутрижелудочно вводили 1 мл раствора АМП в суточной дозе по 15 мг каждого АМП на крысу в течение 3-х дней, группа АМК. Через 5 дней, с продолжением соответствующей диеты, животных наркотизировали изофлураном, брали цельную кровь из задней полой вены для гематологического, биохимического и иммунологического анализа ($n = 7$). Клинический анализ крови выполняли на автоматическом ветеринарном гематологическом анализаторе (URIT-3000 Vet Plus, URIT Medical Electronic, КНР). Уровень лактатдегидрогеназы (LDH), щелочной фосфа-

тазы (ALP), креатинина, лактата, мочевой кислоты, мочевины оценивали с помощью биохимического анализатора (BioChem Analette, HTI, США). Уровень фактора некроза опухолей альфа (TNF α), интерлейкина-8 (IL-8), моноцитарного хемотаксического белка (MCP-1), С-реактивного белка (CRP), липополисахарида (LPS) оценивали иммуноферментным методом (MR-96A, Mindray, КНР). Измерение массовой концентрации короткоцепочечных жирных кислот (КЦКЖ): уксусной – УК, пропионовой – ПК, изомасляной – ИЗК, изовалериановой – ИВК в пробах плазмы крови проводилось методом хромато-масс-спектрометрии. Идентификацию КЦКЖ осуществляли по времени удерживания и характеристическим ионам, в режиме регистрации индивидуальных ионов (SIM), установленным при предварительной градуировке прибора на оборудовании: газовый хроматограф Agilent 7890 (Agilent Technologies, США) с масс-селективным детектором. Для количественного определения концентрации определяемого вещества использовалось автоматическое интегрирование хроматограмм с помощью программного обеспечения фирмы Agilent Technologies, США, MSD Chem Station. Для количественного определения использовался метод градуировочного графика.

У оставшихся 7 крыс из каждой группы вскрывали грудную клетку и удаляли сердце для последующей перфузии на модернизированной установке по Лангендорфу, в соответствии с методикой [10]. В ходе перфузии изолированного сердца регистрировали частоту сердечных сокращений (уд/мин), коронарный поток (мл/мин), величины конечно-диастолического (КДДЛЖ, мм рт. ст.) и систолического

ТАБЛИЦА 1. БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ КРЫС В ГРУППАХ ПО ОКОНЧАНИИ ЭКСПЕРИМЕНТА ($n = 7$ В КАЖДОЙ ГРУППЕ)

TABLE 1. BIOCHEMICAL BLOOD PARAMETERS OF RATS IN GROUPS AT THE END OF THE EXPERIMENT ($n = 7$ IN EACH GROUP)

Группа Group	LDH (ед/л) un/l	ALP (ед/л) un/l	Лактат Lactate $\mu\text{m/l}$	Мочевая кислота Uric Acid $\mu\text{m/l}$	Мочевина Urea $\mu\text{m/l}$
КТР CTR	486 $\pm$ 273	82,1 $\pm$ 33,9	6,14 $\pm$ 2,44	38,61 $\pm$ 9,82	4,39 $\pm$ 1,25
ПВО FAO	503 $\pm$ 218	106,4 $\pm$ 29,5	7,66 $\pm$ 3,28	42,50 $\pm$ 3,54	4,98 $\pm$ 1,03
ВТК IBD	1269 $\pm$ 532	151,3 $\pm$ 79,5	5,92 $\pm$ 0,89	71,92 $\pm$ 20,94	4,07 $\pm$ 0,73
АМК AMC	1182 $\pm$ 697	395,0 $\pm$ 228,9	5,78 $\pm$ 1,40	66,17 $\pm$ 30,06	2,90 $\pm$ 0,88

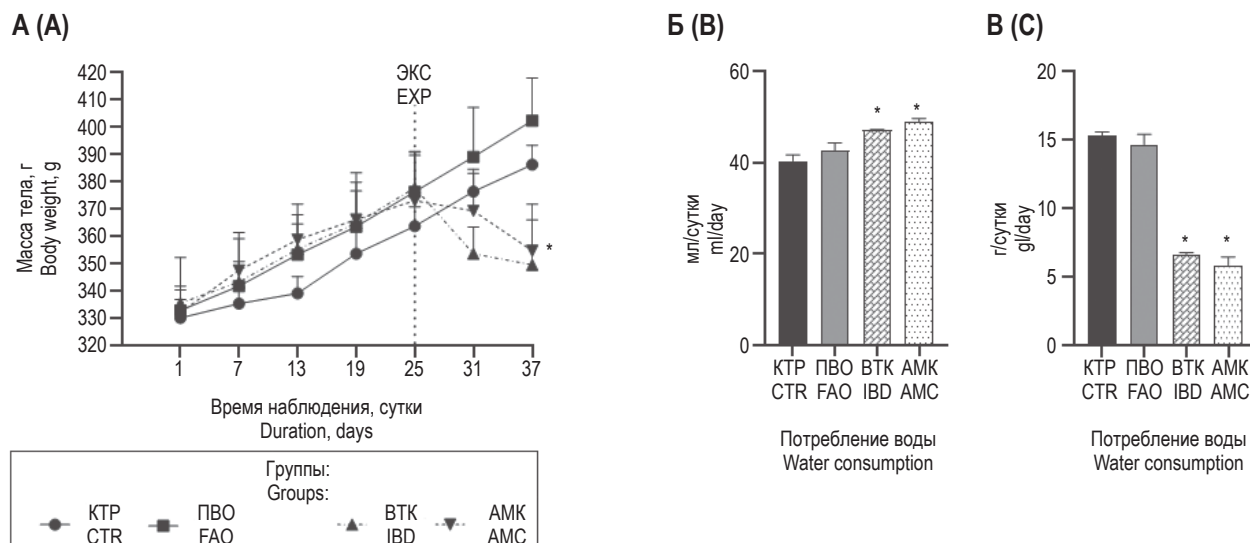


Рисунок 1. Динамика изменения массы тела, потребления воды, корма

Примечание. КТП – контроль, ПВО – первичное висцеральное ожирение, БТК – острое воспаление толстого кишечника, АМК – смесь АМП. * – достоверные отличия при $p < 0,05$ по отношению к ПВО.

Figure 1. Dynamics of changes in body weight, water consumption, food consumption

Note. CTR, control; FAO, primary visceral obesity; IBD, acute colon inflammation; AMC, a mixture of AMP. *, significant differences at $p < 0.05$ relative to FAO.

(СДЛЖ, мм рт. ст.) давления в левом желудочке на персональном компьютере с помощью программы PhysExp 3.0 [9]. После завершения реперфузии осуществляли планиметрическую оценку размера инфаркта путем окраски срезов сердца 1% трифенилтетразолием хлоридом. Размер инфаркта выражали в процентах от общей площади среза и вычисляли среднее значение для данного среза по результатам анализа 5 срезов. Посмертно измерялась масса висцерального жира и основных внутренних органов, также отбирались пробы фекалий для генетического исследования толстокишечной микробиоты. Использовали метод ПЦР-РВ с использованием реагентов для выделения ДНК (QIAamp DNA Stool Mini Kit, США, Интерлаб-сервис) и комплекта реагентов «Колонофлор-16» ООО «АльфаЛаб». На протяжении всего эксперимента ежедневно с 9 до 10 утра проводили оценку клинического статуса животных, потребления корма и воды, а также массы тела животных.

Для каждого из определяемых показателей рассчитывали среднее значение (М) и стандартное отклонение ($\pm m$). Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни (программный пакет Statistica 9.0). Корреляционный анализ ряда показателей – на основе критерия Спирмена. Для проверки различий микробного состава между группами крыс был использован критерий Краскела–Уоллиса. В качестве данных для анализа использовались

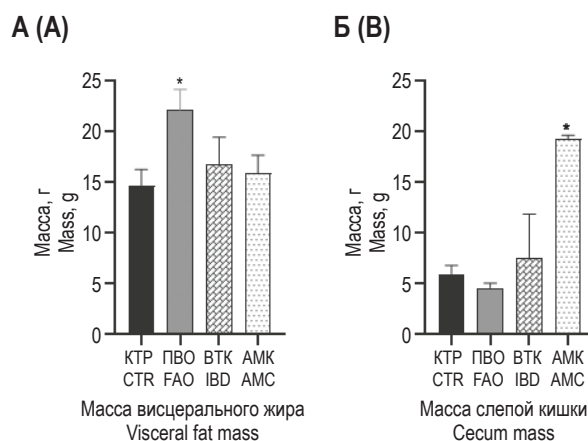


Рисунок 2. Масса внутренних органов

Примечание. См. примечание к рисунку 1. * – достоверные отличия при $p < 0,05$ по отношению к КТП.

Figure 2. Mass of internal organs

Note. As for Figure 1. *, significant differences at $p < 0.05$ relative to CTR.

десятичные логарифмы полученных значений КОЕ/г для каждой из определяемых групп бактерий методом ПЦР-РВ. Значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Масса тела, органов, потребление воды и корма

Масса тела крыс с ЖУД по окончании эксперимента по сравнению с крысами контрольной группы КТП была больше на 5%, тогда как у крыс

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ $TNF\alpha$, IL-8, MCP-1, CRP И LPS В КРОВИ ЖИВОТНЫХ (n = 7 В КАЖДОЙ ГРУППЕ)

TABLE 2. $TNF\alpha$, IL-8, MCP-1, CRP AND LPS LEVELS IN THE BLOOD OF ANIMALS (n = 7 IN EACH GROUP)

Группа Group	$TNF\alpha$ (пг/мл) pg/ml	IL-8 (пг/мл) pg/ml	MCP-1 (пг/мл) pg/ml	CRP (пг/мл) pg/ml	LPS (пг/мл) pg/ml
КТР CTR	3,44±1,49	3,42±0,46	58,60±2,38	1,15±0,38	6,17±2,79
ПВО FAO	5,53±1,93	6,20±1,70	52,4±4,8	1,52±0,19	13,28±1,36*
ВТК IBD	9,68±2,69*	11,55±5,46*	259,5±190,9*	1,62±0,49	18,39±7,24*
АМК AMC	6,51±2,05	14,03±2,43*	56,4±13,2	1,33±0,43	7,23±3,42

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой КТР.

Note. *, $p < 0.05$ compared with the CTR group.

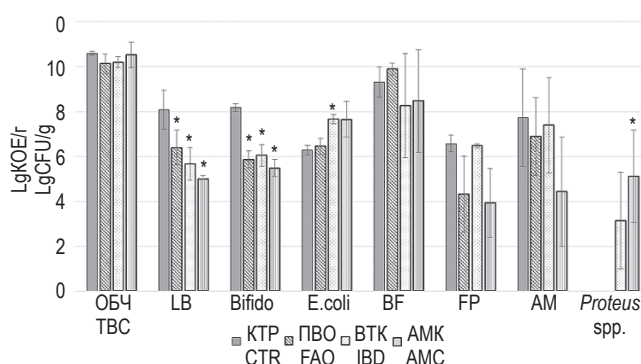


Рисунок 3. Бактериальный состав микробиоты фекалий крыс из различных групп (ПЦР-РВ)

Примечание. См. примечание к рисунку 1. ОБЧ – общее бактериальное число, LB – *Lactobacillus* spp., Bifido – *Bifidobacterium* spp., BF – *Bacteroides fragilis*, FP – *Faecalobacterium prausnitzii*, AM – *Akkermansia muciniphila*. * – достоверные отличия при $p < 0,05$ по отношению к КТР.

Figure 3. Bacterial composition of the microbiota in rats' faeces from different groups (PCR-RT)

Note. As for Figure 1. TBC, total bacterial count; LB, *Lactobacillus* spp.; Bifido, *Bifidobacterium* spp.; BF, *Bacteroides fragilis*; FP, *Faecalobacterium prausnitzii*; AM, *Akkermansia muciniphila*.

*, significant differences at $p < 0.05$ relative to CTR.

в группах ВТК и АМК была меньше на 11-14% по сравнению с группой ПВО (рис. 1А).

У крыс в группе ПВО потребление корма и воды в течение опыта было близко к показателям в группе КТР. В группах ВТК и АМК после моделирования ОБТК потребление воды увеличилось на 17 и 21%, а потребление корма снизилось в 3 и более раз соответственно ($p < 0,05$) (рис. 1Б, В).

У крыс в группе ПВО масса висцерального жира была увеличенной в 2 раза при уменьшении массы слепой кишки на 29% ($p < 0,05$), что

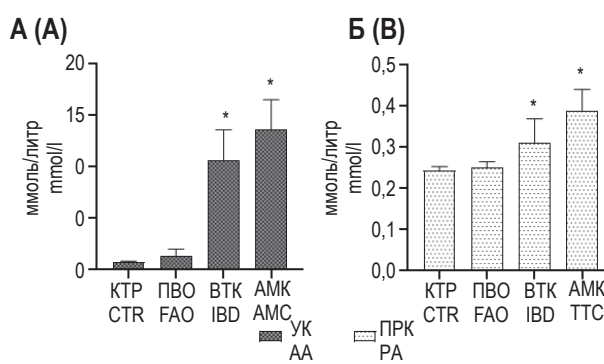


Рисунок 4. Количественное содержание уксусной и пропионовой кислоты в сыворотке крови

Примечание. См. примечание к рисунку 1. * – достоверные отличия при $p < 0,05$ по отношению к КТР.

Figure 4. Quantitative content of acetic and propionic acid in serum

Note. As for Figure 1. *, significant differences at $p < 0.05$ relative to CTR.

показывает эффективность предложенной нами 28-дневной ЖУД для моделирования ПВО. Масса висцерального жира у крыс в группах ВТК и АМК была на 33 и 24%, а слепой кишки в группе АМК – более чем в 3 раза больше, чем в группе КТР (рис. 2А, Б).

Исследование крови

Гематологические показатели в исследованных группах животных не отличались, за исключением увеличения числа лейкоцитов на 10-13% в группах ПВО, ВТК и АМК. Также в группах АМК и ВТК наблюдалось увеличение числа

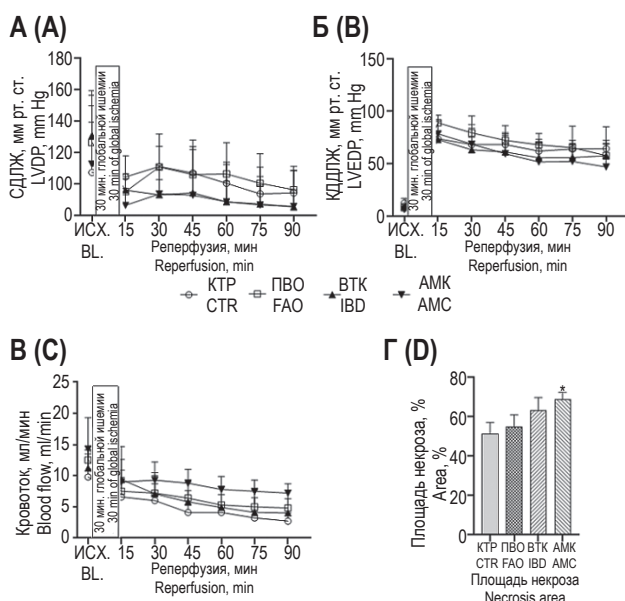


Рисунок 5. Гемодинамические показатели и площадь некроза миокарда изолированного сердца

Figure 5. Hemodynamic parameters and area of myocardial necrosis of an isolated heart

тромбоцитов более чем на 30%. При явных различиях биохимических параметров в крови у крыс, в группах ВТК и АМК, особенно при увеличении активности LDH и ALP, концентрации мочевой кислоты в 2 и более раза, статистически значимых между группами не отмечено, что говорит о широкой норме реакции биохимических показателей экспериментальных животных под влиянием АМП и воздействий, использованных для моделирования ПВО и ХИВЗТК (табл. 1).

Уровень TNF α был значимо выше в группе ВТК, а IL-8 — в группах ВТК и АМК в сравнении с группой КТР. В группе СВР концентрация МХБ была больше, чем во всех остальных группах, почти в 5 раз. Уровень ЛПС в группах ПВО и ВТК был в 2 и 3 раза больше, чем в контроле соответственно. Уровень СРБ в группах не различался (табл. 2).

Результаты ПЦР-РВ

В группе ПВО выявлено уменьшение количества лактобацилл и бифидобактерий на 30% ($p < 0,05$) относительно группы КТР, кроме того, отмечена еще более низкая численность *Lactobacillus* spp. в группе АМК по сравнению с группой ПВО. Как у крыс с ПВО, так и у крыс групп ВТК и АМП не отмечено изменений численности *B. fragilis*. Уровень *E. coli* повышен в группе ВТК относительно группы ПВО ($p < 0,05$), также отмечено более высокое содержание *E. coli* в группе АМК относительно группы ПВО. Следует заметить, что в группах КТР и ПВО не был выявлен *Proteus* spp., но в группе АМК от-

мечено присутствие протея у 67% крыс, а в группе ВТК — у 40% исследованных животных.

Почти у всех крыс, за редкими исключениями, как в норме (группа КТР), так и при влиянии различных факторов (группы ПВО, АМК и ВТК) количество *Bacteroides fragilis* значительно превышало количество *Faecalibacterium prausnitzii*, что является характеристикой анаэробного дисбаланса микробиоты у крыс с данным микробиологическим статусом (рис. 3).

Представители родов *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Candida* spp., энтеропатогенные *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., а также *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Parvimonas micra*, *Bacteroides thetaiotaomicron* и *Clostridium difficile* не были обнаружены методом ПЦР-РВ в исследуемых образцах.

Короткоцепочечные жирные кислоты

Анализ результатов, представленных на рисунке 4, свидетельствует о том, что в группе ПВО ЖУД ведет к незначительному повышению концентрации УК на 50%, в группе с ОБТК этот показатель увеличился почти в 8 раз, а в группе с ААД почти в 10 раз ($p < 0,05$). Удельное содержание пропионовой кислоты возрастало на 24% по отношению к группе ОБТК по отношению к ПВО, а в группе с введением АМП увеличилось на 80% ($p < 0,05$) (рис. 4 А, Б). Динамика изменений концентрации изомасляной и изовалериановой кислот в плазме крови крыс во всех группах не отмечена.

Гемодинамические и морфофункциональные характеристики изолированного сердца

Динамика изменения давления в левом желудочке в ходе 30-минутной глобальной ишемии в группах ВТК и АМК существенно не отличалась от контрольной группы при снижении на 45% в середине ишемии. СДЛЖ в группах ВТК и АМК были примерно равными, но по отношению к КТР и ПВО меньше от 20 до 10% во всех контрольных точках (рис. 5А). КДЛЖ в группе ВТК и АМК было ниже по отношению к контролю и группе сравнения — от 20 до 10% (рис. 5Б). Также не отмечено существенных отличий показателей скорости коронарного кровотока на протяжении периода реперфузии в группах КТР и ВТК, однако в группе АМК она была больше от 17% в начале опыта до 34% по окончании по сравнению с контролем (рис. 5В).

В группах КТР и ПВО площадь некроза составила $51,2 \pm 5,9$ и $54,7 \pm 6,3\%$. В группах ВТК и АМК была отмечена тенденция к увеличению размера некроза по сравнению с контролем ($63,1 \pm 6,72$ и $68,9 \pm 3,6\%$) соответственно, которая, однако, была статистически значимой только в группе

АМК, на 35% больше по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 5Г). Корреляционный анализ показал, что связь между изменениями массы слепой кишки и площади некроза миокарда изолированного сердца после 30-минутной глобальной ишемии — прямая, теснота (сила) связи по шкале Чеддока — высокая. Коэффициент корреляции Спирмена (ρ) равен 0,800. Зависимость признаков статистически значима ($p < 0,05$).

Гистологическое исследование тонкого и толстого кишечника

Гистологический анализ дистальных участков толстого кишечника крыс с ОВТК показал присутствие проявлений токсического колита разной степени выраженности. Отмечается дистрофия поверхностных эпителиоцитов, полнокровие сосудов субэпителиальных отделов стромы.

Умеренно выраженные дефекты: определяют язвы со слизисто-гнойным экссудатом. Эпителиальная выстилка сохранена на большей части поверхности кишки. В местах язвенных дефектов отмечается замещение слизистой оболочки грануляционной тканью, отек и воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой и подслизистой основы. Полнокровие сосудов микроциркуляторного русла и лимфатических сосудов. Мышечная оболочка расширена, определяется воспалительная инфильтрация разной степени выраженности с присутствием лимфоидного и эозинофильного компонента. В некоторых местах реэпителизация язв одним слоем эпителиоцитов.

Ярко выраженные дефекты: большая часть поверхности слизистой изъязвлена, эпителиальная выстилка сохранена частично. Замещение слизистой оболочки, собственной пластинки слизистой и в тяжелых случаях подслизистой основы грануляционной тканью, отек и воспалительная инфильтрация. Усилен фибриноидный компонент. Полнокровие сосудов микроциркуляторного русла и лимфатических сосудов. Мышечная оболочка расширена, определяется воспалительная инфильтрация разной степени выраженности с присутствием лимфоидного и эозинофильного компонента. Чередование зон со светлыми и темными миоцитами.

В дистальном участке тонкого кишечника определяются реактивные изменения, а именно гиперплазия бокаловидных клеток, отек, инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки лимфоцитами и нейтрофилами, десквамация апикальной части ворсинок.

Обсуждение

Ежегодный прирост заболеваемости ВЗК составляет от 5 до 20 случаев на 100 тысяч населения, и этот показатель продолжает увеличиваться (приблизительно в 6 раз за последние 10 лет).

Россия занимает 10-е место по заболеваемости в Европе: показатель составляет 5,1 на 100 000 населения. [8]. ВЗК (ЯК и БК) — заболевания, которые среди других болезней ЖКТ существенно ухудшают качество жизни, зачастую приводят к инвалидизации пациентов и нередко к летальному исходу. Особенности ВЗК в настоящее время являются отсутствие полного понимания происхождения заболеваний, непредсказуемость клинического течения, несовершенство методов лечения на фоне роста заболеваемости во всем мире. Только накопление знаний в области эпидемиологии, генетики, кишечной микрофлоры и иммунного ответа позволят улучшить результаты лечения пациентов, страдающих ВЗК.

Исследования бактериального генома (микробиома) показали: у тучных субъектов, как у животных, так и у людей, на фоне избытка жирной пищи, микробное разнообразие меньше, чем у лиц с нормальной массой тела [26]. Нами было показано снижение представительства *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. как в результате ЖУД и ХИВЗТК, так и под воздействием смеси АМП широкого спектра действия, однако в результате всех этих манипуляций ОБЧ не изменилось. В группе ВТК отмечено увеличение *E. coli*, а после антибиотикотерапии, помимо эшерихий, отмечена манифестация *Proteus* spp., что согласуется с данными о существующем антагонизме между некоторыми штаммами *Lactobacillus* spp. и *E. coli* в единой экосистеме [21]. Вопреки утверждениям о том, что как у генетически тучных мышей (ob/ob), так и у мышей с ожирением, вызванным диетой (DIO), наблюдается относительное снижение обилия бактероидов и компенсаторное увеличение *Firmicutes* по сравнению с тощими сородичами [25], а также представителей группы кишечной палочки [2], нами у крыс с ПВО показано снижение представительства *Lactobacillus* spp. при некотором увеличении численности *Bacteroides fragilis*. На рост популяции *E. coli* в данной модели ЖУД не повлияла.

Из исследованных КЦЖК в плазме крови в данной работе особое внимание привлекли уксусная и пропионовая кислота. Известное микробное происхождение этих метаболитов и существенное увеличение их удельного содержания в крови в группах ВТК и АМП с большой долей вероятности может быть связано с ростом представительства энтеробактерий, в результате ослабления резистентности макроорганизма или медикаментозной терапии [6]. Метаболическими маркерами кишечной микрофлоры, изменяющей свой состав при различных патологических состояниях, являются летучие жирные кислоты. Уксусная и пропионовая кислоты — это продукты брожения факультативных и облигатных анаэробов, в том числе патогенных и условно-пато-

генных. В норме эти кислоты, наряду с самими микроорганизмами, участвуют в обеспечении локальных и системных функций макроорганизма, но в высоких концентрациях они обладают токсическим действием на органы.

С учетом современной концепции этиопатогенеза ВЗК, заключающейся в том, что ни один из элементов патогенеза в отдельности не может стать пусковым механизмом развития заболевания, в представленной работе создана модель ВЗК с использованием двух основных этиопатогенетических направлений: факторов, влияющих на микробиоту и на иммунный ответ организма [14]. Использование созданной модели ВЗК, осложненного антибиотик-ассоциированным колитом, для анализа биохимических, иммуногистохимических и гистологических результатов с экстраполяцией их в клиническую практику может способствовать выявлению прогностических и предиктивных факторов развития заболевания [16]. Более глубокое изучение внутрипросветной и пристеночной микрофлоры позволит разработать эффективные методы лечения [11, 15].

Ранее нами было показано недостоверное снижение резистентности миокарда изолированного сердца после введения АМП по аналогичному протоколу здоровым крысам с различным микробным статусом [3, 5]. Результаты исследования при моделировании ХИВЗТК у крыс с ААД на фоне первичного висцерального ожирения обоснованно демонстрируют коморбидное влияние патологических процессов ЖКТ: ВЗК и ААД, включая изменения баланса провоспалительных цитокинов и нарушений морфофункциональных характеристик изолированного сердца с ослаблением резистентности миокарда к ИРП. ПВО в данном моделировании ССВР является не только дополнительным фактором осложнения коморбидности в современной популяции с точки зрения нарушения баланса кишечной микробиоты [20], про- и противовоспалительных цитокинов [24], но и необходимым элементом при моделировании тяжелой травмирующей патологии толстого кишечника, что подтверждается наблю-

дением о парадоксальном снижении летальности от сепсиса у критических больных с избыточной массой тела [18].

Заключение

Учитывая известную иммуномодуляторную роль КЦКЖ, в данной биомедицинской модели, очевидна взаимосвязь между ХИВЗТК и ААД, изменением состава кишечной микробиоты, ростом концентрации провоспалительных цитокинов и ЛПС в крови. Однако введение АМП при сохранении титра *E. coli*, но при росте протея, вызвало снижение уровня ЛПС, TNF α и МХБ при высокой концентрации уксусной и пропионовой кислоты. Учитывая высокий показатель IL-8, можно предположить, что решающее значение в нарушении морфофункциональных характеристик миокарда играет нарушение баланса цитокинов системы воспаления и токсического влияния высоких концентраций КЦКЖ. По характеру гуморальных реакций организма и изменения состава микробиоты кишечника можно сделать заключение об адекватности созданной модели дисбиозу кишечника с типичными чертами хронического воспаления, характерной для многих соматических патологий.

В литературе есть сведения о кардиопротективном влиянии АМП тетрациклинового ряда, ванкомицина и др. на устойчивость миокарда у здоровых животных к ИРП с подтверждением механизма подавления экспрессии коллагена и предсердного натрийуретического пептида [22, 27]. В данном исследовании, напротив, показано ухудшение морфофункциональных показателей миокарда под воздействием АМП. Несмотря на наличие данных, подтверждающих изменение цитокинового профиля, состава кишечной микробиоты и КЦКЖ, необходимо выяснение возможных молекулярных механизмов прямого, опосредованного, отдельного и суммационного влияния ХИВЗТК и АМП у животных с висцеральным ожирением на морфофункциональные структуры миокарда для объективной трансляции научных сведений из эксперимента в клиническую практику.

Список литературы / References

1. Аверина О.В., Ермоленко Е.И., Ратушный А.Ю., Тарасова Е.А., Борщев Ю.Ю., Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Котылева М.П., Даниленко В.Н., Суворов А.Н. Влияние пробиотиков на продукцию цитокинов в системах *in vitro* и *in vivo* // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 443-454. [Averina O.V., Ermolenko E.I., Ratushnyi A.Yu., Tarasova E.A., Borshchev Yu.Yu., Leontieva G.F., Kramskaya T.A., Kotyleva M.P., Danilenko V.N., Suvorov A.N. Influence of probiotics on cytokine production in the *in vitro* and *in vivo* systems. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 443-454. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-443-454.
2. Борщев Ю.Ю., Ермоленко Е.И. Метаболический синдром и микроэкология кишечника // Трансляционная медицина, 2014. № 1. С. 19-28. [Borshchev Yu.Yu., Ermolenko E.I. Metabolic syndrome and intestinal microecology. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*, 2014, no. 1, pp. 19-28. (In Russ.)]

3. Борщев Ю.Ю., Минасян С.М., Буровенко И.Ю., Борщев В.Ю., Галагудза М.М. Антибиотик-индуцированный дисбиоз кишечника и устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению у крыс с различным микробиологическим статусом // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2018. № 10 (158). С. 62-67. [Borshchev Yu.Yu., Minasian S.M., Burovenko I.Yu., Borshchev V.Yu., Galagudza M.M. Antibiotic-induced intestinal dysbiosis and myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in rats with different microbiological status. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Russian Journal of Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2018, no. 10 (158), pp. 62-67. (In Russ.)]
4. Борщев Ю.Ю., Минасян С.М., Буровенко И.Ю., Ермоленко Е.И., Суворов А.Н., Галагудза М.М. Влияние пробиотического штамма *E. Faecium* L3 на устойчивость миокарда к ишемии-реперфузии в модели антибиотик-индуцированного дисбиоза кишечника // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2016. Т. 102, № 11. С. 1323-1332. [Borshchev Yu.Yu., Minasian S.M., Burovenko I.Yu., Ermolenko E.I., Suvorov A.N., Galagudza M.M. Influence of probiotic strain *E. Faecium* L3 on myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in the model of antibiotic-induced intestinal dysbiosis. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*, 2016, Vol. 102, no. 11, pp. 1323-1332. (In Russ.)]
5. Борщев Ю.Ю., Синица А.В., Захарченко М.М., Борщев В.Ю., Буровенко И.Ю., Галагудза М.М. Влияние антибиотикоиндуцированного дисбиоза и его коррекции пробиотиками на устойчивость миокарда к ишемически-реперфузионному повреждению у крыс SPF категории // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2018. Т. 166, № 10. С. 426-430. [Borshchev Yu.Yu., Sinitsa A.V., Zakharchenko M.M., Borshchev V.Yu., Burovenko I.Yu., Galagudza M.M. Effect of antibiotic-induced disbiosis and its correction with probiotics on myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in SPF rats. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2018, Vol. 166, no. 10, pp. 426-430. (In Russ.)]
6. Джаветц Э., Мельник Дж.Л., Эйдельберг Э.А. Руководство по медицинской микробиологии: в 3-х т.: пер. с англ. / под ред. Т.В. Перадзе. М.: Медицина, 1982. Т. 2. С. 9-18. [Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A. Review of medical microbiology: in 3 vol. Engl. transl. Ed. T.V. Peradze]. Moscow: Medicine, 1982, Vol. 2, pp. 9-18.
7. Дисбиоз кишечника: руководство по диагностике и лечению / под ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова. СПб.: ИнформМед, 2009. 276 с. [Intestinal dysbiosis. Guidelines for diagnosis and treatment. Ed. E.I. Tkachenko, A.N. Suvorov]. St. Petersburg: InformMed, 2009. 276 p.
8. Князев О.В., Шкурко Т.В., Фадеева Н.А., Бакулин И.Г., Бордин Д.С. Эпидемиология хронических воспалительных заболеваний кишечника. Вчера, сегодня, завтра // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2017. № 3 (139). С. 4-12. [Knyazev O.V., Shkurko T.V., Fadeeva N.A., Bakulin I.G., Bordin D.S. Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease. Yesterday, today, tomorrow. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Russian Journal of Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2017, no. 3 (139), pp. 4-12. (In Russ.)]
9. Королев Д.В., Александров И.В., Галагудза М.М., Сыренский А.В., Сонин Д.Л., Егорова Е.И. Автоматизация получения и обработки данных физиологического эксперимента // Регионарное кровообращение и микроциркуляция, 2008. Т. 7, № 2 (26). С. 79-84. [Korolev D.V., Alexandrov I.V., Galagoudza M.M., Syrensky A.V., Sonin D.L., Egorova E.I. Automation of data acquisition and processing in physiological experiments. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya = Regional Hemodynamics and Microcirculation*, 2008, Vol. 7, no. 2 (26), pp. 79-84. (In Russ.)]
10. Минасян С.М., Бадриханова Л.Р., Галагудза М.М., Курапеев Д.И. Сравнительное исследование защитного эффекта гипотермии, ишемического preconditionирования и модифицированных кардиоплегических растворов при ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция, 2008. Т. 7, № 2 (26). С. 72-78. Minasian S.M., Badrikhanova L.R., Galagudza M.M., Kurapeev D.I. Comparative research of protective effect of a hypothermia, ischemic preconditioning and the modified cardioplegic solutions at ischemia-reperfusion of the rat's isolated heart. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya = Regional Hemodynamics and Microcirculation*, 2008, Vol. 7, no. 2, pp. 72-78. (In Russ.)]
11. Осиков М.В., Симонян Е.В., Бакеева А.Е., Бойко М.С., Бивалькевич В.А. Экспериментальное моделирование и перспективные направления коррекции гомеостаза при воспалительных заболеваниях кишечника // Аспирантский вестник Поволжья, 2018. № 1-2. С. 153-160. [Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E., Boyko M.S., Bivalkevich V.A. Experimental modeling and future directions of homeostasis correction in inflammatory bowel diseases. *Aspirantskiy vestnik Povolzhya = Postgraduate Bulletin of the Volga Region*, 2018, no. 1-2, pp. 153-160. (In Russ.)]
12. Пикунов Д.Ю., Рыбаков Е.Г., Головенко Е.Г. Псевдомембранозный колит (обзор литературы) // Колопроктология, 2010. № 2 (32). С. 55-60. [Pikunov D.Yu., Rybakov E.G., Golovenko E.G. Pseudomembranous colitis (literature review). *Koloproktologiya = Coloproctology*, 2010, no. 2 (32), pp. 55-60. (In Russ.)]

13. Разенак Й., Ситкин С.И. Воспалительные заболевания кишечника: практическое руководство. 7-е изд., перераб. и доп. М.: Форте принт, 2014. 108 с. [Rasenack J., Sitkin S.I. Inflammatory bowel diseases: a practical guide. 7th edition, revised and enlarged]. Moscow: Forte print, 2014. 108 p.
14. Фиокки К. Этиопатогенез воспалительных заболеваний кишечника // Колопроктология, 2015. № 1 (51). С. 5-20. [Fiochi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Koloproktologiya = Coloproctology*, 2015, no. 1 (51), pp. 5-20. (In Russ.)]
15. Adams S.D., Mercer D.W. Fulminant *Clostridium difficile* colitis. *Curr. Opin. Crit. Care*, 2007, Vol. 13, no. 4, pp. 450-455.
16. Baumgart D.C., Sandborn W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, 2007, Vol. 369, no. 9573, pp. 1641-1657.
17. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 1992, Vol. 101, no. 6, pp. 1644-1655.
18. Dobner J., Kaser S. Body mass index and the risk of infection – from underweight to obesity. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2018, Vol. 24, no. 1, pp. 24-28.
19. Ermolenko E., Rybalchenko O., Borshev Y., Tarasova E., Kramskaya T., Leontieva G., Kotyleva M., Orlova O., Abdurasulova I., Suvorov A. Influence of monostrain and multistain probiotics on immunity, intestinal ultrastructure and microbiota in experimental dysbiosis. *Benef. Microbes*, 2018, Vol. 9, no. 6, pp. 937-949.
20. Fallucca F., Fontana L., Fallucca S., Pianesi M. Gut microbiota and Ma-Pi 2 macrobiotic diet in the treatment of type 2 diabetes. *World J. Diabetes*, 2015, Vol. 6, no. 3, pp. 403-411.
21. Kumar M., Dhaka P., Vijay D., Vergis J., Mohan V., Kumar A., Kurkure N.V., Barbuddhe S.B., Malik S.V., Rawool D.B. Antimicrobial effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* against multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2016, Vol. 48, no. 3, pp. 265-270.
22. Lam V., Su J., Koprowski S., Hsu A., Tweddell J.S., Rafiee P., Gross G.J., Salzman N.H., Baker J.E. Intestinal microbiota determine severity of myocardial infarction in rats. *FASEB J.*, 2012, Vol. 26, pp. 1727-1735.
23. Martín R., Chain F., Miquel S., Motta JP., Vergnolle N., Sokol H., Langella P. Using murine colitis models to analyze probiotics-host interactions. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2017, Vol. 41, no. 1, pp. S49-S70.
24. Saad M.J., Santos A., Prada P.O. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. *Physiology (Bethesda)*, 2016, Vol. 31, no. 4, pp. 283-293.
25. Sanmiguel C., Gupta A., Mayer E.A. Gut microbiome and obesity: a plausible explanation for obesity. *Curr. Obes. Rep.*, 2015, Vol. 4, no. 2, pp. 250-261.
26. Tordjman J., Guerre-Millo M., Clement K. Adipose tissue inflammation and liver pathology in human obesity. *Diabetes Metab.*, 2008, Vol. 34, no. 6, Pt 2, pp. 658-663.
27. Zhu H., Sun X., Wang D., Hu N., Zhang Y. Doxycycline ameliorates aggregation of collagen and atrial natriuretic peptide in murine post-infarction heart. *Eur. J. Pharmacol.*, 2015, Vol. 754, pp. 66-72.

Авторы:

Борщев Ю.Ю. — заведующий НИО токсикологии, Институт экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург; ООО «НИЦ Пробиокод СП», Москва, Россия

Буровенко И.Ю. — аспирант ГОУ «Приднестровский государственный университет имени Т.Г. Шевченко», г. Тирасполь, Республика Молдова; ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Карасева А.Б. — научный сотрудник НИО молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Borshchev Yu. Yu., Head, Research Department of Toxicology, Institute of Experimental Medicine, V. Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg; LLC “Research Center Probiocode SP”, Moscow, Russian Federation

Burovenko I. Yu., Postgraduate Student, T. Shevchenko Pridnestrovian State University, Tiraspol, Republic of Moldova; V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Karaseva A. B., Research Associate, Research Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Минасян С.М. — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ микроциркуляции и метаболизма миокарда, Институт экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ; ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Борщев В.Ю. — студент, Технический университет Молдовы, г. Кишинев, Республика Молдова

Семенова Н.Ю. — научный сотрудник НИО патоморфологии ЦДТИ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Борщева О.В. — младший научный сотрудник НИО токсикологии ЦДТИ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Половинкин В.В. — д.м.н., заведующий колопроктологическим отделением ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

Родионов Г.Г. — д.м.н., заведующий НИЛ токсикологии и лекарственного мониторинга ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Суворов А.Н. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующий НИО молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; заведующий кафедрой фундаментальной медицины и медицинских технологий ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Галагудза М.М. — д.м.н., член-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ; ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Minasyan S.M., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory for Myocardial Microcirculation and Metabolism, V. Almazov National Medical Research Centre; First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Borshchev V. Yu., Student, Technical University of Moldova, Kishinev, Republic of Moldova

Semenova N. Yu., Research Associate, Research Department of Pathology, V. Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

Borshcheva O. V., Junior Research Associate, Research Department of Toxicology, V. Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

Polovinkin V.V., PhD, MD (Medicine), Head, Coloproctological Department, Research Institute — S. Ochapovsky Regional Clinical Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation

Rodionov G.G., PhD, MD (Medicine) Head, Research Laboratory of Toxicology and Drug Monitoring, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Suvorov A.N., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Research Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine; Head, Department of Fundamental Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Galagudza M.M., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Institute of Experimental Medicine, V. Almazov National Medical Research Centre; First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 30.07.2019
Принята к печати 03.10.2019

Received 30.07.2019
Accepted 03.10.2019

ПАТОГЕНЕЗ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ, ИНДУЦИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ПОДТИПАМИ ВИРУСА ГРИППА А, У МЫШЕЙ

Поромов А.А.¹, Махмудова Н.Р.¹, Фалынскова И.Н.¹, Глубокова Е.А.¹,
Карташова Н.П.¹, Федякина И.Т.², Свитич О.А.¹, Ленёва И.А.¹

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

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Вторичные бактериальные осложнения после гриппозной инфекции являются основной причиной летальности при гриппе. Несмотря на широкое внедрение сезонных гриппозных вакцин, противовирусных препаратов и антибиотиков, актуальным является комплексное изучение развития патогенеза вирусно-бактериальной пневмонии, в том числе и на фоне терапии. В настоящем исследовании воспроизведена модель гриппозной инфекции вирусами гриппа А подтипов А/Калифорния/04/2009МА (пандемия H1N1 2009), А/Пуэрто-Рико/8/34(H1N1), Анадырь/177/2009 (H1N1) и А/Аичи/2/69 (H3N2), а также модель сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии последовательным заражением вирусами гриппа и грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus*. В работе оценены особенности гриппозной инфекции с учетом самого патогена (подтип вируса, заражающая доза, размножение вируса в легких), состояния организма (выживаемость, средняя продолжительность жизни, изменение веса мышей), его иммунной системы (продукция про- и противовоспалительных цитокинов в легких мышей) в том числе на фоне противовирусной (осельтамивиром) и антибактериальной (цефуроксимом) терапии. Патогенез гриппа А после заражения мышей разными субтипами вируса по показателям смертности животных и титру вируса не различается, однако различается по скорости набора массы и выработке некоторых цитокинов (IL-10, IFN γ , TNF α). В контрольной группе, группах, зараженных вирусами гриппа А, и группе, зараженной бактериями *S. aureus*, гибели животных не наблюдалось. Развитие вторичной бактериальной пневмонии приводило к полной или значительной гибели животных, прирост веса не наблюдался, а концентрации IFN γ и TNF α достигали высоких значений. Среди исследованных вирусов гриппа А наиболее патогенным в модели гриппозной инфекции являлся пандемический штамм А/Калифорния/04/2009МА. Как противовирусная, так и антибактериальная терапия приводили к снижению смертности в модели вторичной бактериальной пневмонии, уменьшению титра вируса в легких и стабилизации потери веса животных по этим показателям группы терапии достоверно не отличались между собой. Уровень

Адрес для переписки:

Поромов Артем Андреевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (495) 674-76-91.
E-mail: poromov@instmech.ru

Address for correspondence:

Poromov Artem A.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow,
Malyy Kazenny lane, 5a.
Phone: 7 (495) 674-76-91.
E-mail: poromov@instmech.ru

Образец цитирования:

А.А. Поромов, Н.Р. Махмудова, И.Н. Фалынскова,
Е.А. Глубокова, Н.П. Карташова, И.Т. Федякина,
О.А. Свитич, И.А. Ленёва «Патогенез гриппозной
инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии,
индуцированных различными подтипами вируса
гриппа А, у мышей» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 1. С. 99–110.
doi: 10.15789/1563-0625-IVI-1840

© Поромов А.А. и соавт., 2020

For citation:

A.A. Poromov, N.R. Makhmudova, I.N. Falynskova,
E.A. Glubokova, N.P. Kartashova, I.T. Fedyakina,
O.A. Svitich, I.A. Leneva "Influenza virus infection and post-
viral bacterial pneumonia pathogenesis induced by different
subtypes of influenza virus in mice", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 1,
pp. 99–110.
doi: 10.15789/1563-0625-IVI-1840

DOI: 10.15789/1563-0625-IVI-1840

цитокинов IL-2, IL-10, IFN γ снижался на фоне терапии, при этом в группе, получавшей цефуроксим в большей степени, концентрации IL-10 и IFN γ в легких мышей в группах терапии различались, что может быть связано с механизмами терапевтического действия исследуемых препаратов. Таким образом, противовирусная терапия гриппозной инфекции и комбинированная терапия вирусно-бактериальной пневмонии могут являться эффективным инструментом снижения летальности при гриппе.

Ключевые слова: грипп, *Staphylococcus aureus*, вторичная бактериальная пневмония, осельтамивр, цефуроксим, цитокины

INFLUENZA VIRUS INFECTION AND POST-VIRAL BACTERIAL PNEUMONIA PATHOGENESIS INDUCED BY DIFFERENT SUBTYPES OF INFLUENZA VIRUS IN MICE

Poromov A.A.^a, Makhmudova N.R.^a, Falynskova I.N.^a, Glubokova E.A.^a, Kartashova N.P.^a, Fedyakina I.T.^b, Svitich O.A.^a, Leneva I.A.^a

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

^b N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Secondary bacterial infections after influenza virus infection further increase morbidity and mortality due to influenza. Despite of seasonal influenza vaccination, antiviral drugs and antibiotics are widely used in viral/bacterial pneumonia therapy. Therefore, further comprehensive study of the infection pathogenesis is relevant. Murine models for influenza virus infection were reproduced with different virus subtypes A/California/04/2009MA (pandemic H1N1 2009), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) and A/Aichi/2/69 (H3N2), Anadyr/177/2009 (H1N1) and for post-influenza bacterial pneumonia caused by the Gram-positive *Staphylococcus aureus*. After the infection occurs, its pathogenic features were detected by daily monitoring the mortality (survival) and morbidity rate (body weight loss) and, in addition, viral pathogenesis also was evaluated by assessing virus replication (viral titer) and humoral immune responses (production of pro- and anti-inflammatory cytokines) in respiratory tract of infected mice including during antiviral (oseltamivir) and antibacterial (cefuroxime) therapy. Mortality and virus titer in the infected mice did not differ significantly between the groups of different influenza A virus subtypes. However, production of cytokines (IL-10, IFN γ , TNF α) and weight gain proved to be different. Mortality of the mice reached 100% after secondary bacterial infection, whereas IFN γ and TNF α levels in mice lung increased reached maximal values in the treated groups. Viral subtype A/California/04/2009MA of influenza A was most pathogenic in mouse model of secondary bacterial pneumonia. Antiviral and antibacterial treatment caused a decrease in mortality, reduced viral titers in lungs, and retain body weight gain of mice. According to these points, the treatment groups did not significantly differ from each other. At the same time, it should be noted that the cytokine production significantly decreased in the treated groups, and IL-10 and IFN γ levels in lungs were different, that may be due to therapeutic mechanisms of these drugs. Thus, antiviral therapy for influenza infection and combination therapy for viral-bacterial pneumonia can be an effective tool to reduce mortality of influenza.

Keywords: influenza, *Staphylococcus aureus*, secondary bacterial pneumonia, oseltamivir, cefuroxime, cytokine

Введение

Грипп — острое респираторное заболевание, наносящее вред здоровью людей и приводящее к огромным экономическим потерям. Несмотря на широкое внедрение сезонных гриппозных вакцин, противовирусных препаратов и антибиотиков, проблема бактериальных осложнений при гриппе не перестала быть актуальной. Большая часть смертельных исходов от гриппа обусловлена вторичными бактериальными осложнениями, среди которых ведущую роль занимают пневмо-

нии. Показано, что распространенность пневмоний значительно увеличивается после эпидемий гриппа, а достоверное увеличение смертности в результате пневмоний фиксировалось во время пандемий 1918, 1957, 1968 и 2009 годов. Во время последней пандемии, вызванной H1N1 в 2009 г., 25-56% тяжелых форм заболеваний и смертельных исходов были ассоциированы со вторичной пневмонией, из них 14-46% привели к смертельным исходам. В настоящее время ВОЗ ставит задачу снижения пневмоний после гриппозной инфекции как одну из первоочередных [10].

В «Программе исследований ВОЗ по гриппу с позиции общественного здравоохранения» также подчеркивается важность проведения научных исследований постгриппозных осложнений [12].

Патогенез вирусно-бактериальной пневмонии определяет комплексное разнообразие факторов, зависящих как от возбудителей, так и от состояния иммунной системы организма. К настоящему времени имеется ряд исследований, определяющих роль бактериального патогена в этом взаимодействии [14]. При этом в научной литературе значительно меньшее внимание уделено роли вируса в патогенезе вирусно-бактериальной пневмонии, в частности различиям между отдельными подтипами вирусов гриппа, хотя именно он вносит ведущий вклад в возникновение летального синергизма при сочетанном заражении.

Важная роль в развитии инфекции принадлежит самому организму, который реализует свой ответ через иммунную систему. В частности, при нарушении ответа на возбудитель ключевое значение может иметь изменение баланса про- и противовоспалительных цитокинов [4]. Количество и соотношение противовоспалительных и провоспалительных цитокинов при пневмонии ассоциировано со степенью тяжести воспалительного процесса, с его переходом на системный уровень и с исходом заболевания. Известно, что выраженность интоксикационного синдрома у пациентов с неосложненным течением гриппа в острый период заболевания сопровождается увеличением концентрации TNF α , IL-10, IL-1ra и снижением IFN γ в сыворотке крови. Продолжительность интоксикационного синдрома при гриппе имеет прямую корреляционную связь с увеличением содержания TNF α , IL-6, IL-8, IL-1ra, IL-10 в крови и обратную — с IL-1 β . Тяжелое течение гриппа характеризуется сохранением высокого уровня TNF α , чрезмерно высоким увеличением концентрации IL-6 и нормализацией концентрации IL-1 β , также высоким уровнем IL-1 α и IL-10 при отсутствии IL-4 в системном кровотоке [11, 16, 17]. Продукция провоспалительных цитокинов, а также увеличение количества клеток-продуцентов связаны и с риском развития бактериальных осложнений. Так, Fukuyama и соавт. показали, что увеличение количества легочных макрофагов коррелирует с риском возникновения пневмонии, развившейся при пандемическом гриппе А H1N1 в 2009 году [4]. Таким образом, оценка провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в организме — это один из показателей, характеризующих состояние иммунной системы и ее реакцию на внедрение и размножение патогена (вирусной и/или бактериальной природы), и может служить

потенциальным прогностическим критерием исхода и тяжести заболевания.

Актуально исследование механизмов иммунитета, в частности цитокинового профиля, при гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии в моделях *in vivo*. Ранее нами была разработана мышьяная модель вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) и *S. aureus*, в которой был выявлен летальный синергизм между патогенами, отмечаемый в эпидемиологических наблюдениях [1]. Как продолжение этой работы проведено изучение патогенеза выявленного синергизма на модели бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции, вызванной различными вирусами гриппа А, а также осуществлена экспериментальная оценка влияния лекарственных препаратов разного механизма действия в отработанной модели.

Целью данного исследования являлось изучение особенностей патогенеза гриппозной инфекции в экспериментальной вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением различными подтипами вируса гриппа А и грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus*. Изучение патогенеза заключалось в выявлении особенностей гриппозной инфекции с учетом самого патогена (подтип вируса, заражающая доза, размножение вируса в легких), состояния организма (выживаемость, средняя продолжительность жизни, изменение веса), его иммунной системы (продукция про- и противовоспалительных цитокинов). Кроме того, для оценки вклада противовирусной и антибактериальной терапии в патогенез вирусно-бактериальной пневмонии была проведена экспериментальная оценка аспектов действия двух лекарственных препаратов — противогриппозного препарата ингибитора нейраминидазы — осельтамивир и цефалоспоринового антибиотика II поколения широкого спектра действия — цефуроксим.

Материалы и методы

Патогены, клеточные линии

Для моделирования гриппозной инфекции использован адаптированный к мышам штамм вируса H1N1 А/Калифорния/04/2009 пндм 2009 (ATCC, США), штамм Анадырь/177/2009 (H1N1), выделенный от погибшего от пандемического гриппа пациента и полученный из музея ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, эталонные лабораторные штаммы вируса гриппа подтипов А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) и А/Аичи/2/69 (H3N2), полученные из музея ФГБУ НИИ гриппа им. А. Смородин-

цева МЗ РФ. Для моделирования бактериальной пневмонии использовали штамм *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) из коллекции микроорганизмов НИИВС им. И.И. Мечникова. Для получения живой культуры добавляли 1 мл питательного бульона (ГРМ-бульон) (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск) и инкубировали 4 ч при 37 °С, после чего производили посев. Для титрования вируса использовались клетки почечного эпителия собаки линии MDCK (ATCC, США).

Исследуемые препараты

В экспериментах использовали противогриппозный препарат ингибитор нейраминидазы — осельтамивир (Тамифлю, капсулы, Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) и цефалоспориновый антибиотик II поколения широкого спектра действия, активный в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. — цефутоксим (Цефутоксим, порошок для приготовления раствора, ОАО «Синтез», Россия). Доза осельтамивира рассчитана согласно методике, описанной в работе Говорковой и соавт. [5]. Для приготовления растворов препараты растворяли в дистиллированной воде перед проведением эксперимента. Дозы осельтамивира и цефутоксима готовились и указаны из расчета содержания чистой субстанции в лекарственной форме. Дозы препаратов рассчитывали в относительных весовых единицах — мг/кг массы тела животных в сутки. Животным осельтамивир вводили перорально в объеме 200 мкл, цефутоксим вводили подкожно в объеме 200 мкл.

Животные

В работе использовались белые мыши BALB/C, самки, массой 12–14 г, из питомника «Андреевка» (Московская область, Россия). Содержание и работа с животными проводились в соответствии с Процедурами по содержанию лабораторных животных в вивариях, с учетом принципов Надеждающей лабораторной практики.

Модель вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции

Для моделирования вирусно-бактериальной пневмонии использована методика, описанная в работе Ленёвой и соавт. [1]. Животные предварительно взвешивались и случайным образом разделялись на группы. Контрольные группы, содержащие по 15 животных, инфицировали под легким наркозом сублетальными дозами вирусов гриппа в дозе 0,5 МЛД₅₀ (50% летальная доза для мышей). На 4-й день после заражения мышей дополнительно инфицировали *S. aureus* в дозе 2×10^7 КОЕ/мл. Инфицированные таким же образом животные были лечены осельтамивиром или цефутоксимом (по 40 мышей в группе). Осельтамивир вводили в дозе 10 мг/кг/день за 4 часа до заражения и далее ежедневно в те-

чение 5 дней после инфицирования вирусом гриппа. Цефутоксим вводили подкожно в дозе 20 мг/кг/сут. дважды в день со дня бактериального заражения и далее в течение трех суток. Также были сформированы группы вирусных (по 10 животных) и бактериального (5 мышей) контролей, инфицированные такими же дозами и в те же промежутки времени патогенами по отдельности. Кроме того, была сформирована группа интактных неинфицированных животных (5 особей), которые получали ФСБ (фосфатно-солевой буфер) в соответствующие заражению патогенами дни. Динамику веса животных оценивали ежедневно в течение 21 суток.

Получение легких мышей

Для оценки титра вируса в легких на 4-й день после вирусного заражения в каждой группе забивали по 3 мыши и извлекали легкие. Промывали 0,01М раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ, «ЭКОсервис», Россия). Затем гомогенизировали и ресуспендировали в 1 мл холодного стерильного раствора ФСБ. Суспензию очищали от клеточного дербиса центрифугированием при 2000 g в течение 10 минут. 0,1 мл супернатанта отбирали для определения уровня цитокинов, а оставшийся супернатант использовали для замера инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK.

Определение титра вируса в легких мышей

Для определения инфекционного титра вируса клетки MDCK помещали в 96-луночные планшеты по 30 000–35 000 клеток на лунку. Выращивали до полного монослоя в среде MEM («Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Россия) с добавлением 5% фетальной сыворотки телят, 10 мМ глутамин и антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл). Перед заражением клетки 2 раза промывали средой MEM без сыворотки. Готовили 10-кратные разведения каждой пробы вируса из легких (цельный до 10^{-8}) на среде с добавлением (2 мкг/мл). Полученными разведениями заражали монослой 4-х лунок планшета. Инкубировали в течение 72 часов при 37 °С, атмосфера 5% CO₂. Клетки фиксировали раствором формальдегида. Инфекционный титр вируса определяли по методу Рида и Менча и выражали в log₁₀ ТЦИД₅₀/0,1 мл (тканевая цитопатическая инфекционная доза).

Определение уровня цитокинов в биологическом материале

С целью определения уровня цитокинов (IL-2, IL-10, TNFα и IFNγ) из каждой серии экспериментов использовали биологический материал — супернатант легких, от 3 животных из каждой группы. Содержание цитокинов в образцах оценивали с помощью x-MAP-технологии, методом мультиплексного анализа белков на двухлуче-

вом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein System, Bio-Rad, США). Анализ проводили в соответствии с протоколом производителя в 96-луночных планшетах Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Assay. В каждую лунку планшета добавляли по 50 мкл суспензии полистироловых гранул размером 5,5 мкм, входящих в набор тест-системы. Планшет дважды промывали 100 мкл буфером Bio-Plex. Добавляли в лунки согласно дизайну планшета по 50 мкл исследуемых образцов и стандартов. После инкубации при покачивании в шейкере закрытого алюминиевой фольгой планшета (850 об/мин в течение 30 минут) его трижды промывали 100 мкл буфера. Затем в каждую лунку планшета добавляли по 25 мкл антицитокинных антител, входящих в набор тест-системы. Процедуру повторяли, добавляя по 50 мкл смеси для детекции. Далее планшет трижды промывали 100 мкл буфера, входящего в комплект реагентов для проведения анализа, и добавляли по 125 мкл флуоресцентной метки, входящей в набор тест-системы. Анализ оптической плотности проводили при помощи программы Bio-Plex Manager Software 6.1.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета RStudio (версия 1.0.143). Для количественных показателей результат представлен в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD) или медианы с указанием 95% двухстороннего доверительного интервала (CI), для качественных в виде доли или процентов с указанием 95% двухстороннего CI. В графиках данные представлены в виде значения $\pm$ стандартная ошибка (SE). Для межгрупповых сравнений количественных показателей использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для множественных сравнений использовался тест Тьюки. Для оценки динамики веса и выживаемости мышей использовали нелинейную четырехпараметрическую логистическую регрессию (пакет “drc2”) и построение кривых выживаемости методом Каплана–Мейера (пакет “survival”). Множественные сравнения выживаемости животных между группами проведены с использованием Log-Rank test [6], поправка на множественные сравнения проведена по [2]. При использовании статистических процедур различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Патогенез летальной вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после гриппозной инфекции различными вирусами гриппа

Для моделирования использовались сублетальные заражающие дозы (0,5 МЛД₅₀)

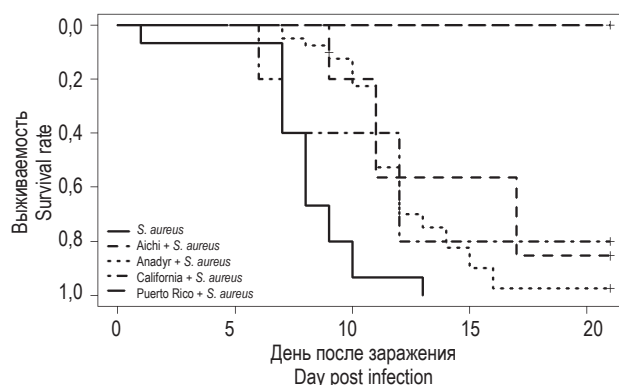


Рисунок 1. Выживаемость животных на фоне гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии после нее (кривые дожития, построенные по методу Каплана–Мейера)

Figure 1. Survival rates in mouse models for influenza A virus infection and post-viral bacterial pneumonia (Kaplan–Meier curves)

вирусов гриппа: трех подтипа H1N1 А/Калифорния/04/2009МА (California), А/Пуэрто-Рико/8/34 (Puerto Rico), А/Анадырь/177/2009 (Anadyr) и одного подтипа H3N2 А/Аичи/2/69МА (Aichi). Моделирование гриппозной инфекции проводилось в четырех экспериментальных группах по 10 животных и 5 животных в контрольной – без заражения. Моделирование вирусно-бактериальной пневмонии проводили в четырех экспериментальных группах и в группе *S. aureus* без вирусного заражения. Общее количество животных в экспериментальных группах – 15, в группе *S. aureus* 5 животных.

Несмотря на клинические признаки болезни, а также потерю веса, в группах мышей, зараженных отдельно вирусами или *S. aureus*, все животные остались живы в течение всего периода наблюдения (табл. 1), в группе, зараженной только вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009, наблюдалась 10% гибель животных (рис. 1). Титр вируса в легких животных, инфицированных вирусами гриппа А/Калифорния/04/2009 и А/Аичи/2/69 был несколько выше, чем в группах, инфицированных А/Пуэрто Рико /8/34 и А/Анадырь/177/2009 (H1N1), однако различия не являются значимыми (табл. 1).

В отличие от групп вирусного контроля в группах, зараженных последовательно *S. aureus*, после инфицирования вирусами наблюдалась полная или значительная гибель мышей (рис. 1). Процент смертности и потеря веса в группах зависели от штамма вируса (рис. 2, 3). Полная гибель животных с наибольшей потерей веса наблюдалась в группах, инфицированных вирусами гриппа А/Калифорния/04/2009 и А/Аичи/2/69МА. Определение титра вируса в легких животных

ТАБЛИЦА 1. ВЫЖИВАЕМОСТЬ, СРЕДНЯЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И ВИРУСНЫЙ ТИТР ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСАМИ ГРИППА ТИПА А И ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ

TABLE 1. SURVIVAL RATE, LIFE EXPECTANCY AND VIRAL TITER IN MOUSE MODELS FOR INFLUENZA A VIRUS INFECTION AND POST-VIRAL BACTERIAL PNEUMONIA

Группа Group	Животных в группе Animals per group	Выживаемость ² Survival rate ²	Титр вируса ³ Viral titre ³	Средняя продолжительность жизни (дней) ⁴ Mean of life expectancy (days) ⁴
Контроль Control	5	100%	–	> 21
<i>S. aureus</i>	10	100%	–	> 21
А/Калифорния/04/2009(H1N1) A/California/04/2009(H1N1)	10	90% (50,8-98,6)	4,2±1,1	> 21
А/Калифорния/04/2009 + <i>S. aureus</i> A/California /04/2009 + <i>S. aureus</i>	40 ¹	2,5 (0,1-11,3)	> 6,0	11 (11-12)
А/Пуэрто-Рико/8/34(H1N1) A/Puerto Rico/8/34(H1N1)	10	100%	3,80±0,58	> 21
А/Пуэрто-Рико/8/34 + <i>S. aureus</i> A/Puerto Rico/8/34 + <i>S. aureus</i>	15	20% (4,8-42,4)	5,1±1,5	12 (6-12)
А/Анадырь/177/2009 (H1N1) A/Anadyr/177/2009 (H1N1)	10	100%	3,0±0,0	> 21
А/Анадырь/177/2009 + <i>S. aureus</i> A/Anadyr/177/2009 + <i>S. aureus</i>	15	14,5% (2,3-37,0)	4,6±0,2	11 (9-17)
А/Аичи/2/69(H3N2) A/Aichi/2/69(H3N2)	10	100%	4,1±1,5	> 21
А/Аичи/2/69 + <i>S. aureus</i> A/Aichi2/69 + <i>S. aureus</i>	15	0%	3,9±2,4	8 (7-9)
А/Калифорния/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Осельтамивир A/California/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Oseltamivir	40	60% (43,2-73,3)	1,89±1,30	20 (14- > 21)
А/Калифорния/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Цефуроксим A/California/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Cefuroxime	40	45% (29,3-59,9)	1,0±1,0	13 (11- > 21)

Примечание. ¹ – с учетом группы животных, включенных в эксперимент по оценке действия лекарственных препаратов; ² – доля живых особей через 21 сутки после заражения (95% CI); ³ – log₁₀ TCID_{50/0,1}; по 3 животных из каждой экспериментальной группы; среднее значение ± SD; ⁴ – медиана (95% ДИ).

Note. ¹, included mice embedded in antivirals effectiveness evaluation experiment; ², rate of alive mice after 21 day post infection (95% CI); ³, log₁₀ TCID_{50/0,1}; n = 3 per experimental group, mean±SD; ⁴, median (95% CI).

выявило, что размножение вирусов при заражении ими отдельно во всех случаях было достоверно ниже, чем при комбинированном заражении (табл. 1). Наиболее высокий титр вируса наблюдался в группах мышей, инфицированных *S. aureus*, после заражения их пандемическими вирусами гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1) и А/Анадырь/177/2009 (H1N1).

Эффективность противовирусной и антибактериальной терапии

Полученные в первой серии опытов результаты указывают на пандемический штамм А/Калифорния/04/2009(H1N1) как обладающий наиболее сильными факторами патогенности. По этой причине для дальнейшего изучения влияния на патогенез вирусно-бактериальной пневмонии противовирусной и антибактериальной терапии для индуцирования инфекции был выбран вирус гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1). Терапия противовирусным препаратом осельтамивиром в дозе 10 мг/кг/день снижала гибель животных до 40% (рис. 4), увеличивая среднюю продолжительность жизни в 2 раза по сравнению с инфицированными нелечеными животными (табл. 1). На фоне терапии антибактериальным препаратом цефуроксимом гибель животных в среднем наступала раньше по сравнению с группой животных, леченных осельтамивиром, средняя продолжительности жизни была меньше, составляя в среднем 13 дней, 11 дней у нелеченых контрольных животных. Выживаемость в группах животных, получавших цефуроксим не отличалась от таковой в группе животных, леченных осельтамивиром ($p = 0,3$, Log-Rank test), при этом выживаемость в этих группах была достоверно выше, чем в группе инфицированных нелеченых животных ($p < 0,001$, Log-Rank test). Вес тела мышей в группе терапии антибиотиком цефуроксимом не отличался от контрольной группы, а в группе терапии осельтамивиром был выше в среднем на 20% к 21 дню после заражения (рис. 5). Данные по клиническим признакам заболевания коррелировали с данными вирусологического изучения легких. Титр вируса в группе животных с вторичной бактериальной пневмонией, леченных осельтамивиром или цефуроксимом, был значительно ниже титра вируса по сравнению с нелечеными животными (табл. 1).

Содержание цитокинов в легких

На моделях сублетальной гриппозной инфекции и летальной вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции показано, что различные штаммы вирусов гриппа индуцируют продукцию цитокинов в легких (табл. 2). В нашем исследовании были выбраны IL-2 и IFN γ (отвечают за пролиферацию Т-лимфоцитов, клеточный адаптивный иммунитет), провоспалитель-

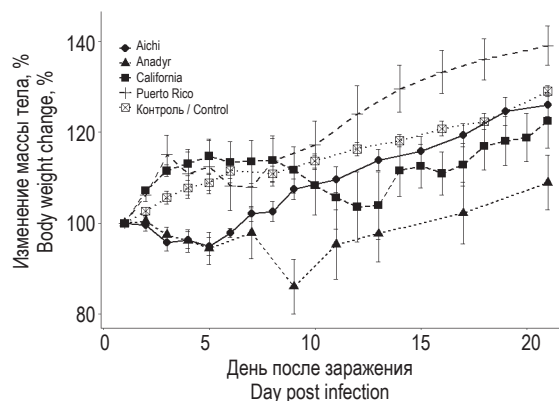


Рисунок 2. Изменение относительной массы тела мышей на фоне гриппозной инфекции (M $\pm$ SE)

Figure 2. Relative mice body weight change in mouse models for influenza A virus infection (M $\pm$ SE)

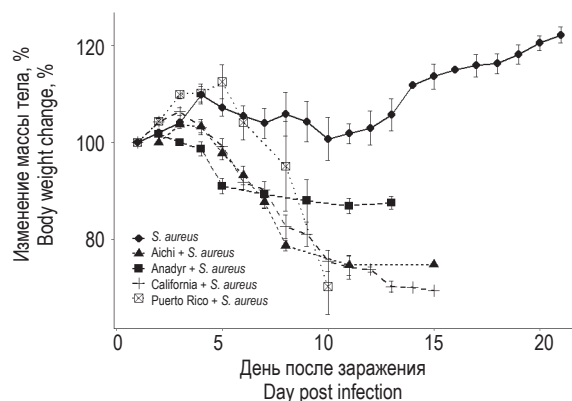


Рисунок 3. Изменение относительной массы тела на фоне гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии после нее (M $\pm$ SE)

Figure 3. Relative mice body weight change in mouse models for post-viral bacterial pneumonia (M $\pm$ SE)

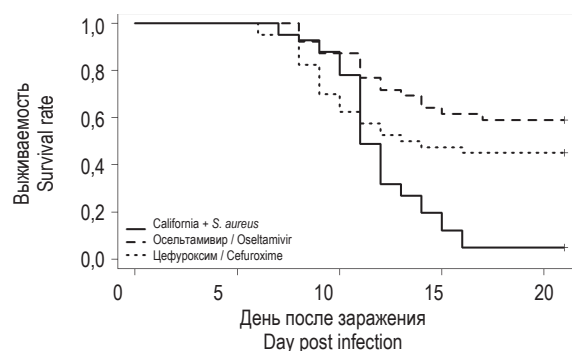


Рисунок 4. Выживаемость животных при гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии после нее на фоне терапии противовирусным (осельтамивир, 10 мг/кг/сут.) и антибактериальным (цефуроксим, 40 мг/кг/сут.) препаратами (кривые дожития, построенные по методу Каплана–Мейера)

Figure 4. Survival rates in mouse models for influenza A virus infection and post-viral bacterial pneumonia during treatment with antiviral (oseltamivir, 10 mg/kg/day) and antibacterial (cefuroxime, 40 mg/kg/day), Kaplan–Meier curves

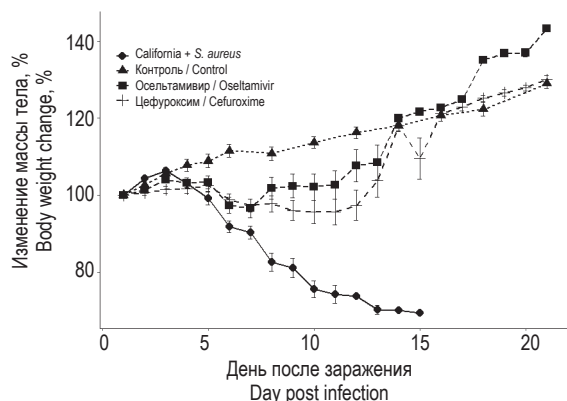


Рисунок 5. Изменение относительной массы тела животных при гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии после нее на фоне терапии противовирусным (осельтамивир, 10 мг/кг/сут.) и антибактериальным (цефуроксим, 40 мг/кг/сут.) препаратами (M±SE)

Figure 5. Relative body weight change in mouse models for influenza A virus infection and post-viral bacterial pneumonia during treatment with antiviral (oseltamivir, 10 mg/kg/day) and antibacterial (cefuroxime, 40 mg/kg/day) drugs, M±SE

тельный цитокин TNFα и противовоспалительный цитокин IL-10.

Показано, что концентрация в легких IL-2 в группах гриппозной инфекции была в 2-3 раза выше, чем в группе сравнения. В случае с бактериальной пневмонией концентрация цитокина статистически значимо не различалась для разных штаммов вируса гриппа. Исключение наблюдали только в случае А/Анадырь/177/2009, где концентрация IL-2 в 5 раз снижалась после заражения *S. aureus*.

Концентрация IFNγ, одного из противовирусных цитокинов, была значительно выше во всех исследуемых группах лабораторных животных с гриппозной инфекцией относительно контрольных значений (в 16,8 – 34 раза). После инфицирования *S. aureus* показатель IFNγ статистически значимо не изменялся в случае совместного инфицирования штаммами А/Калифорния/04/2009(H1N1) и А/Пуэрто-Рико/8/34(H1N1). В случае других штаммов вируса гриппа наблюдали разнонаправленный эффект: так, в случае А/Анадырь/177/2009 (H1N1) после инфицирования стафилококком определяли достоверное снижение продукции IFNγ в легких в 4 раза, в то время как А/Аичи/2/69(H3N2) – увеличение в 3 раза. Полученный неоднозначный эффект можно объяснить тем, что интерфероны являются значимыми цитокинами, направленными против вирусной инфекции. Вероятно, различные штаммы вируса гриппа могут по-разному влиять на выработку IFN, что, скорее всего, генетически опосредованно.

По содержанию TNFα особенно выделяется группа Пуэрто-Рико/8/34(H1N1), где его содержание достигает $319,50 \pm 75,06$ мкг/мл, для этой группы также характерно высокое содержание IL-10 и IFNγ в легких животных. Показатель TNFα при инфицировании *S. aureus* увеличивался более чем в два раза, при этом показатель IL-10 снижается. Таким образом, выявлено изменение цитокинового профиля в легких мышей под действием вируса гриппа и *S. aureus*.

Уровень цитокинов IL-2, IL-10, IFNγ снижается на фоне терапии, при этом в группе, получавшей цефуроксим в большей степени, значительно увеличивается содержание в легких TNFα при бактериальном заражении и далее, на фоне терапии, достигает максимальных значений в группе, получавшей цефуроксим.

Обсуждение

Моделирование гриппозной инфекции и осложнений после нее обусловлено комплексом множества сложных взаимодействий, обусловленных как генетическими особенностями организма-хозяина, связанными с устойчивостью или чувствительностью к инфекции [15], так и особенностями вируса гриппа. Данное исследование направлено на изучение патогенеза в экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции, индуцированной вирусами гриппа А с различными патогенетическими свойствами, среди которых можно выделить, например, штамм Калифорния, связанный с пандемией 2009 года, или штамм Анадырь, патогенез которого у человека связан с развитием вирусной пневмонии.

Инфицирование различными вирусами гриппа позволило выявить ряд различий в протекании и исходе пневмоний, вызванных как отдельно вирусами гриппа или *S. aureus*, так и их сочетанием. Показано, что заражение животных вирусами приводило к их размножению в легких в высоких титрах, а дальнейшее присоединение бактериальной пневмонии сопровождалось значительной потерей веса и гибелью животных. Сравнительное изучение вирусов подтипа H1N1 в экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции позволило выделить пандемический вирус А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) как наиболее вирулентный. Данный факт показывает, что пандемический штамм А/Калифорния/04/2009МА обладает более сильными факторами патогенности, повреждающими антибактериальную активность системы врожденного иммунитета, чем вирус А/Пуэрто Рико /8/34. Одним из таких факторов может являться минорный белок PB1-F2, обладающий проапоптотической функцией в от-

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В ЛЕГКИХ ЖИВОТНЫХ, М±SD, мкг/мл (n = 3)

TABLE 2. CYTOKINE LEVELS IN LUNG HOMOGENATES, M±SD, mg/ml (n = 3)

Группа Group	IL-2	IL-10	IFN γ	TNF α
Контроль Control	4,84±1,51	6,36±0,26	4,92±1,05	29,70±9,29
А/Калифорния/04/2009(H1N1) A/California/04/2009(H1N1)	12,3±5,8*	63,5±52,7*	170,8±65,0*	46,0±12,4
А/Калифорния/04/2009 + <i>S. aureus</i> A/California /04/2009 + <i>S. aureus</i>	12,50±4,53*	44,0±24,0*	153,6±71,3*	125,8±129,0
А/Пуэрто-Рико/8/34(H1N1) A/Puerto Rico/8/34(H1N1)	9,92±8,28	55,3±28,6*	146,8±80,1*	319,5±75,0*
А/Пуэрто-Рико/8/34 + <i>S. aureus</i> A/Puerto Rico/8/34 + <i>S. aureus</i>	9,4±13,8	18,0±23,8	132,6±176,2	144,1±132,4
А/Анадырь/177/2009 (H1N1) A/Anadyr/177/2009 (H1N1)	15,0±2,9*	27,3±12,8*	92,6±88,6*	40,3±18,6*
А/Анадырь/177/2009 + <i>S. aureus</i> A/Anadyr/177/2009 + <i>S. aureus</i>	3,62±1,11	4,57±2,46	22,6±5,0*	239,3±103,6*
А/Аичи/2/69(H3N2) A/Aichi/2/69(H3N2)	9,14±2,19*	20,0±20,1	83,7±12,3*	69,8±30,3
А/Аичи/2/69 + <i>S. aureus</i> A/Aichi2/69 + <i>S. aureus</i>	7,80±6,16	31,3±28,9	247,4±357,6*	343,7±420,1
А/Калифорния/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Осельтамивир A/California/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Oseltamivir	9,56±4,00	23,0±12,3*	52,6±26,7*	94,7±51,5*
А/Калифорния/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Цефуроксим A/California/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Cefuroxime	5,68±1,30	13,30±2,10*	12,3±2,7*	147,1±152,5*

Примечание. * – значимые различия от группы контроля, U-критерий Манна–Уитни.

Note. *, indicates significant difference from control, Mann–Whitney U-test.

ношении фагоцитирующих лейкоцитов и способностью провоцировать вторичные бактериальные осложнения [7, 8], первичная структура белка которого отличается у взятых в эксперимент лабораторного и пандемического штаммов [8]. Эти данные коррелируют с клиническими данными, полученными Caini S. и соавт. [3]. Метаанализ 47 клинических исследований выявил, что при одновременной социркуляции вирусов гриппа

А(H1N1)р, А(H3N2) и В в постпандемический период именно подтип А(H1N1)р был несколько чаще ассоциирован с осложнениями в виде вторичной бактериальной пневмонии, использованием искусственной вентиляции легких, а также смертельными исходами.

Кроме того, сходную с вирусом А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) МА вирулентность в модели вторичной бактериальной пнев-

мании проявил штамм вируса гриппа подтипа H3N2 А/Аичи/2/69 МА (H3N2). Возможным объяснением этого факта может быть то, что оба штамма были адаптированы к мышам путем серийного пассирования в легких животных, что, как известно, увеличивает патогенность вируса у мышей.

В настоящее время данные клинических испытаний эффективности противовирусных препаратов по вторичным осложнениям после гриппа ограничены, в частности по причине того, что пациенты групп риска (например, дети, пожилые люди, пациенты с сопутствующими заболеваниями), в наибольшей степени подверженные вторичной инфекции, как правило, из этих исследований исключены. С другой стороны, антибиотики клинически эффективны при бактериальной пневмонии, однако при вторичной бактериальной пневмонии, являющейся осложнением гриппозной инфекции, летальность все еще довольно высока даже на фоне применения антибиотиков. Примером этому могут служить антибиотики ампициллинового ряда, которые, несмотря на хороший бактериостатический эффект, часто не улучшают, а иногда и ухудшают прогноз сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии. Причиной этому является лизис стенок бактерий, приводящий к высвобождению их фрагментов, активирующих воспалительный процесс в легких, что в конечном итоге нередко усиливает тяжесть заболевания [9]. В связи с вышесказанным особую важность приобретает получение экспериментальных данных об эффекте противовирусной и антибактериальной терапии на разработанной модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции. Для данных исследований был выбран наиболее патогенный вирус гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) МА, что отражает эпидемиологические наблюдения по увеличению постгриппозных пневмоний и их тяжести в период пандемии 2009 года. Показано, что применение противогриппозного препарата — ингибитора нейраминидазы осельтамивира или антибиотика цефалоспоринового ряда улучшало исходы инфекции, снижая как смертность

животных, так и титр вируса в легких и увеличивая среднюю продолжительность их жизни. При этом можно отметить, что при одинаковой выживаемости средняя продолжительность жизни при введении антибиотиков была меньше, чем при приеме осельтамивира. В группе, леченной цефуроксимом, гибель животных происходила в первые дни после присоединения бактериальной инфекции.

Количество и соотношение противовоспалительных и провоспалительных цитокинов при бактериальной пневмонии определяют тяжесть воспалительного процесса, его переход на системный уровень и прогноз заболевания [13]. В наибольшей степени гриппозная инфекция и бактериальная пневмония проявляются в индукции синтеза $IFN\gamma$, концентрация которого увеличивается в 20-60 раз по сравнению с контролем. Однако можно выделить группы А/Анадырь/177/2009, в которых содержание противовирусного $IFN\gamma$ характеризуется крайне низкими значениями, а содержание провоспалительного IL-2, высокими, можно предположить, что такой ответ организма приводит к развитию вирусной пневмонии и высокой летальности.

Значительная индукция противовоспалительного IL-10, подавляющего активность макрофагов и Th1-клеток, в большей степени наблюдается на фоне гриппозной инфекции.

Использование данной модели позволяет получить дополнительные данные путем сопоставления эффектов, которые оказывают препараты различных механизмов действия на маркеры течения сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии (клинические, вирусологические и иммунологические) и которые могут быть использованы для разработки стратегии терапии вирусно-бактериальной пневмоний. В частности, полученные результаты показывают, что ранняя противовирусная или комбинированная терапия гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии может являться инструментом снижения летальности при гриппе. С другой стороны, оказываемый противовирусной терапией эффект позволит снизить объемы применения антибактериальных препаратов.

Список литературы / References

1. Ленева И.А., Леонова Е.И., Махмудова Н.Р., Фалынскова, И.Н. Федякина И.Т., Зверев В.В. Разработка экспериментальной модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии // Вопросы вирусологии, 2015. Т. 60, № 5. С. 27-31. [Leneva I.A., Leonova E.I., Makhmudova N.R., Falynskova I.N., Fedyakina I.T., Zverev V.V., Mikhailova N.A. Experimental model of secondary bacterial pneumonia after influenza. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, Vol. 60, no. 5, pp. 27-31. (In Russ.)]
2. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.*, 1995, Vol. 57, no. 1, pp. 289-300.
3. Caini S., Kroneman M., Wieggers T., El Guerche-Seblain C., Paget J. Clinical characteristics and severity of influenza infections by virus type, subtype, and lineage: A systematic literature review. *Influenza Other Respir Viruses*, 2018, Vol. 12, no. 6, pp. 780-792.

4. Fukuyama S., Kawaoka Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr. Opin. Immunol.*, 2011, Vol. 23, no. 4, pp. 481-486.
5. Govorkova E.A., Leneva I.A., Goloubeva O.G., Bush K., Webster R.G. Comparison of efficacies of RWJ-270201, zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, Vol. 45, no. 10, pp. 2723-2732.
6. Harrington D. Linear rank tests in survival analysis. Encyclopedia of biostatistics, 2005. 6100 p.
7. Iverson A.R., Boyd K.L., McAuley J.L., Plano L.R., Hart M.E., McCullers J.A. Influenza virus primes mice for pneumonia from *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, 2011, Vol. 203, no. 6, pp. 880-888.
8. Kamal R.P., Alymova I.V., York I.A. Evolution and Virulence of Influenza A Virus Protein PB1-F2. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 19, no. 1, E96. doi: 10.3390/ijms19010096.
9. Karlström Å., Boyd K.L., English B.K., McCullers J.A. Treatment with protein synthesis inhibitors improves outcomes from secondary bacterial pneumonia following influenza. *J. Infect. Dis.*, 2009, Vol. 199, no. 3, pp. 311-319.
10. Legand A., Briand S., Shindo N., Brooks W.A., de Jong M.D., Farrar J., Aguilar X., Hayden F.G. Addressing the public health burden of respiratory viruses: the Battle against Respiratory Viruses (BRaVe) Initiative. *Future Virol.*, 2013, Vol. 8, no. 10, pp. 953-968.
11. Raj R.S., Bonney E.A., Phillippe M. Influenza, immune system, and pregnancy. *Reprod. Sci.*, 2014, Vol. 21, no. 12, pp. 1434-1451.
12. Shindo N. Making progress on the WHO public health research agenda for influenza. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2013, Vol. 7, Suppl. 2, pp. 1-3.
13. Sladkova T., Kostolansky F. The role of cytokines in the immune response to influenza A virus infection. *Acta Virol.*, 2006, Vol. 50, no. 3, pp. 151-162.
14. Smith M.W., Schmidt J.E., Rehg J.E., Orihuela C.J., McCullers J.A. Induction of pro- and anti-inflammatory molecules in a mouse model of pneumococcal pneumonia after influenza. *Comp. Med.*, 2007, Vol. 57, no. 1, pp. 82-89.
15. Srivastava B., Błażejewska P., Hessmann M., Bruder D., Geffers R., Mauel S., Gruber A.D., Schughart K. Host genetic background strongly influences the response to influenza A virus infections. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, no. 3, e4857. doi: 10.1371/journal.pone.0004857.
16. Teijaro J.R. The role of cytokine responses during influenza virus pathogenesis and potential therapeutic options. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2015, Vol. 386, pp. 3-22.
17. van Reeth K. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet. Microbiol.*, 2000, Vol. 74, no. 1-2, pp. 109-116.

Авторы:

Поромов А.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Махмудова Н.Р. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Фалынская И.Н. — научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Глубокова Е.А. — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Poromov A.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Makhmudova N.R., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Falynskaya I.N., Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Glubokova E.A., Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Карташова Н.П. — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Федякина И.Т. — ведущий научный сотрудник лаборатории экологии вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Ленёва И.А. — д.б.н., заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Kartashova N.P., Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Fedyakina I.T., Leading Research Associate, Laboratory of Virus Ecology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Leneva I.A., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 02.08.2019
Отправлена на доработку 22.10.2019
Принята к печати 03.12.2019

Received 02.08.2019
Revision received 22.10.2019
Accepted 03.12.2019

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИЗАТА НА МОДЕЛЯХ АСЕПТИЧЕСКОГО ЛИМФАДЕНИТА И ПНЕВМОКОККОВОЙ ПНЕВМОНИИ *IN VIVO*

Крышень К.Л.¹, Кухаренко А.Е.², Вичаре А.С.³, Гайдай Е.А.⁴,
Крышень А.А.⁴, Гущин Я.А.¹, Калюжин О.В.⁵, Макарова М.Н.¹,
Макаров В.Г.⁴, Махадеван Б.³

¹ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

² ООО «Эбботт Лэбораториз», Москва, Россия

³ Abbott Healthcare Pvt. Ltd, промышленный район Марол, Восточный Анджери, Мумбаи, Индия

⁴ ООО «Институт доклинических исследований», п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

⁵ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Бактериальные лизаты могут оказывать иммунорегуляторные эффекты при воспалительных заболеваниях, не связанных непосредственно с инфекцией, а также стимулировать иммунный ответ против патогенов, не входящих в комплексный состав лизата. При этом влияние препарата Имудон®, представляющего собой поливалентный бактериальный лизат в форме таблеток для рассасывания, на асептическое воспаление и иммунную защиту от инфекционных агентов, компоненты которых не содержатся в этом лекарственном средстве, ранее не изучалось. Цель работы — определить противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты препарата Имудон® на моделях асептического лимфаденита (у крыс Wistar) и пневмококковой пневмонии (у мышей линии Balb/c). Лимфаденит воспроизводили у крыс путем введения раствора λ-карагинана в шейный лимфатический узел через операционный доступ. При моделировании пневмонии мышам вводили суспензию *Streptococcus pneumoniae* интраназально. Выбор пневмококка обусловлен тем, что Имудон® не содержит антигены этого возбудителя и не является непосредственным индуктором адаптивного иммунного ответа против него. Имудон® вводили внутривентрикулярно в виде суспензии таблеточной массы по лечебно-профилактической схеме ежедневно в течение 14 дней до индукции воспаления и 3 (лимфаденит) или 5 дней (пневмония) после индукции в трех дозах. На модели лимфаденита Имудон® проявлял как системное, так и местное противовоспалительное действие, которое выражалось в снижении количества лейкоцитов и уровня TNFα крови, а также гистологических признаков воспалительной ре-

Адрес для переписки:

Кухаренко Андрей Евгеньевич
ООО «Эбботт Лэбораториз»
125171, Россия, Москва, Ленинградское шоссе,
16а, стр. 1.
Тел.: 8 (495) 258-42-80.
Факс: 8 (495) 258-42-81.
E-mail: ekaterina.kovaleva@abbott.com

Address for correspondence:

Kukharensky Andrey E.
Abbott Laboratories LLC
125171, Russian Federation, Moscow, Leningrad highway,
16a, bldg 1.
Phone: 7 (495) 258-42-80.
Fax: 7 (495) 258-42-81.
E-mail: ekaterina.kovaleva@abbott.com

Образец цитирования:

К.Л. Крышень, А.Е. Кухаренко, А.С. Вичаре,
Е.А. Гайдай, А.А. Крышень, Я.А. Гущин, О.В. Калюжин,
М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, Б. Махадеван
«Противовоспалительные и иммуномодулирующие
эффекты бактериального лизата на моделях
асептического лимфаденита и пневмококковой
пневмонии *in vivo*» // Медицинская иммунология, 2020.
Т. 22, № 1. С. 111-122.
doi: 10.15789/1563-0625-AAI-1758
© Крышень К.Л. и соавт., 2020

For citation:

K.L. Kryshen, A.E. Kukharensky, A.S. Vichare, E.A. Gaidai,
A.A. Kryshen, Ya.A. Gushchin, O.V. Kalyuzhin,
M.N. Makarova, V.G. Makarov, B. Mahadevan "Anti-
inflammatory and immunomodulating effects of the bacterial
lysate in the *in vivo* models of aseptic lymphadenitis and
pneumococcal pneumonia", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 1,
pp. 111-122.
doi: 10.15789/1563-0625-AAI-1758
DOI: 10.15789/1563-0625-AAI-1758

акции в пораженном лимфоузле. Наиболее значимый противовоспалительный эффект выявлен при использовании тестируемого препарата в дозах 2,2 (эквивалентная терапевтической дозе для человека в пересчете на крысу) и 6,6 мг/кг по вышеперечисленным показателям. На модели пневмонии при применении препарата Имудон® в дозах 4,44 (эквивалентная терапевтической дозе для человека в пересчете на мышь) и 13,32 мг/кг обнаруживалась тенденция к увеличению выживаемости в сравнении с контролем. На 5-й день после заражения установлено статистически значимое снижение выраженности воспаления и титра бактерий в легких на фоне применения препарата Имудон® в дозах 4,44 и 13,32 мг/кг. В бронхоальвеолярном лаваже на 5-е сутки после инфицирования наблюдали увеличение титра антипневмококковых иммуноглобулинов А при использовании препарата Имудон® в дозе 13,32 мг/кг в сравнении с контролем. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о высокой противовоспалительной и иммуномодулирующей активности препарата Имудон® и уточняют механизмы ранее описанных клинических эффектов этого препарата при воспалительных заболеваниях различной природы.

Ключевые слова: бактериальные лизаты, Имудон®, иммуностимуляция, иммунорегуляция, асептический лимфаденит, воспаление, фактор некроза опухоли, *Streptococcus pneumoniae*, пневмония, иммуноглобулин А

ANTI-INFLAMMATORY AND IMMUNOMODULATING EFFECTS OF THE BACTERIAL LYSATE IN THE *IN VIVO* MODELS OF ASEPTIC LYMPHADENITIS AND PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA

Kryshen K.L.^a, Kukharensko A.E.^b, Vichare A.S.^c, Gaidai E.A.^d,
Kryshen A.A.^d, Gushchin Ya.A.^a, Kalyuzhin O.V.^e, Makarova M.N.^a,
Makarov V.G.^d, Mahadevan B.^c

^a Home of Pharmacy JSC, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

^b Abbott Laboratories LLC, Moscow, Russian Federation

^c Abbott Healthcare Pvt. Ltd, Marol Industrial Area, Andheri East, Mumbai, India

^d Institute of Pre-clinical Research Ltd, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

^e I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Bacterial lysates may produce immunoregulatory effects in the inflammatory diseases that are not directly caused by infectious agents; they may also stimulate the immune response against pathogens which are not a part of the lysate composition. Imudon® is a polyvalent bacterial lysate that is available in orodispersible tablets. However, the influence of this drug product on aseptic inflammation and immune defense against the infectious agents, the antigens of which are not contained in this preparation have not been studied so far. The aim of this study, therefore, was to determine the anti-inflammatory and immunomodulating effects of Imudon® using the models of aseptic lymphadenitis (in Wistar rats) and pneumococcal pneumonia (in Balb/c mice), i.e., the conditions not related to the specific components of the bacterial lysate. Lymphadenitis was induced in rats by administration of λ -carrageenan into a cervical lymph node via an open operative approach. Whereas pneumonia was induced in mice by administering *Streptococcus pneumoniae* suspension intranasally. The choice of pneumococcus was determined by the absence of pneumococcal antigens in Imudon®, i.e., it cannot be a direct inducer of adaptive immune response against pneumococcal infection. Imudon® was administered intragastrically as a crushed tablet suspension following a therapeutic-preventive regimen (for 14 days daily until the induction of inflammation and for 3 [in the lymphadenitis model] or 5 days [in the model of pneumonia] in three doses thereafter). In the lymphadenitis model, Imudon® demonstrated both local and systemic anti-inflammatory responses manifested in the reduced number of circulating leucocytes and lower TNF α levels and by ameliorated histological features of inflammation in the operated lymph node. In rats, the anti-inflammatory effect was most pronounced when the product was administered at a dose of 2.2 mg/kg (equivalent to a human therapeutic dose) and 6.6 mg/kg. In the model of pneumonia, administration of Imudon® at 4.44 mg/kg (equivalent to a human therapeutic dose) and 13.32 mg/kg demonstrated a trend

towards increased survival rate as compared to the control group. On Day 5 after infection Imudon® (4.44 and 13.32 mg/kg) decreased significantly the severity of inflammation and bacterial titer in the lungs. The titer of anti-pneumococcal immunoglobulins A in the bronchoalveolar lavage fluid were found to be higher in the Imudon® treated group (13.32 mg/kg) compared to control group. The results of this study showed high anti-inflammatory and immunomodulatory activities of Imudon® and provided an insight into the mechanisms that underlie the clinical effects of this drug in various inflammatory diseases.

Keywords: bacterial lysates, Imudon®, immunostimulation, immunoregulation, aseptic lymphadenitis, inflammation, tumor necrosis factor, *Streptococcus pneumoniae*, pneumonia, immunoglobulin A

Введение

Для профилактики острых респираторных инфекций, обострений хронических заболеваний дыхательных путей достаточно широко применяются иммуномодулирующие лекарственные средства, среди которых особое место по степени изученности механизмов действия и доказательности клинической эффективности занимают бактериальные лизаты. У лиц с клиническими проявлениями недостаточности противоинфекционной защиты прием бактериальных лизатов целесообразен не только на разных этапах профилактики (сезонной, внутриочаговой и пост-контактной) инфекций дыхательных путей и ЛОР-органов, но и в комплексном лечении этих заболеваний [3].

Препараты на основе бактериальных лизатов можно разделить на две подгруппы: 1) с системным действием, например ОМ-85 (Бронхо-Мунал® и Бронхо-Ваксом®) и 2) с преимущественно топическим действием, например Имудон® для рассасывания в полости рта и ИРС® 19 для интраназального применения. Доказано, что при разных путях доставки в организм бактериальные лизаты индуцируют альтернативные и в большинстве случаев взаимодополняющие локальные и системные механизмы, в конечном итоге приводящие к увеличению продукции в дыхательных путях и/или полости рта секреторных иммуноглобулинов А (IgA) — ключевого компонента мукозальной противомикробной защиты. Фармакологические эффекты системных и топических бактериальных лизатов определяются стимуляцией не только адаптивного иммунного ответа против входящих в их состав антигенов (АГ) патогенов, но и врожденных защитных механизмов под влиянием ассоциированных с микробами молекулярных паттернов (ММП) [1, 4].

Бактериальные лизаты способны проявлять противовоспалительную и иммунорегуляторную активность при заболеваниях, не связанных непосредственно с бактериальной инфекцией [13, 16], потенцировать врожденные механизмы защиты от патогенов, не входящих в комплексный

состав лизата [4, 9, 18]. Вместе с тем влияние препарата Имудон® на асептическое воспаление и иммунный ответ против инфекционных агентов, АГ которых не содержатся в составе этого препарата, ранее детально не изучалось.

Цель работы — определить противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты препарата Имудон® на моделях асептического шейного лимфаденита у крыс и пневмонии у мышей, вызванной бактериями, компоненты которых не входят в состав исследуемого иммуномодулятора. Для индукции лимфаденита выбран небактериальный триггер λ-каррагинан — комплекс сульфатированных полисахаридов из красных водорослей, способный вызывать асептическое воспаление за счет стимуляции рецепторов TLR2/6 и TLR4/6 [15]. При моделировании пневмонии животных заражали суспензией *Streptococcus pneumoniae*, так как, с одной стороны, эта бактерия является одним из наиболее частых возбудителей внебольничной пневмонии и инфекций ЛОР-органов, а с другой — Имудон® не содержит АГ пневмококка и не является непосредственным индуктором адаптивного иммунного ответа против этого патогена.

Материалы и методы

Исследуемый объект

Объектом исследования служил препарат Имудон® в таблетках для рассасывания (ОАО «Фарм-стандарт-Томскхимфарм», Россия), содержащих 2,7 мг лизатов бактерий (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus pyogenes* groupe A, *Streptococcus sangius* groupe H, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, *Fusobacterium nucleatum* ssp. *fusiforme*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*) и грибов (*Candida albicans*), переданный для исследований ООО «Эбботт Лэбораториз».

Животные

В эксперименте по оценке противовоспалительного потенциала препарата Имудон® на модели каррагинан-индуцированного шейного лимфаденита использовали самок крыс линии

Wistar в возрасте 12-14 недель (6 групп по 10 животных; $n = 60$). Пневмококковую пневмонию моделировали на самцах мышей линии Balb/c категории SPF (specific pathogen free) в возрасте 12-14 недель (5 групп по 10 животных; $n = 50$). Проведение всех опытов *in vivo* было одобрено биоэтической комиссией АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Всех животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях [2]. Световой режим составил 12 часов света и 12 часов темноты. Полнорационный гранулированный комбикорм и воду давали животным *ad libitum* в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки. Крыс содержали в поликарбонатных конвенциональных клетках. Самцов мышей линии Balb/c содержали в специализированной зоне лаборатории микробиологии ООО «Институт доклинических исследований» (лицензия № 47.01.05.001.Л.000001.04.18), в индивидуально-вентилируемых клетках Shanghai Pretty Industries Co., Ltd (Китай) группами по 10 особей. Корм, воду и подстил (кукурузные гранулы) предварительно автоклавились.

Моделирование шейного лимфаденита у крыс

Индукция шейного лимфаденита была выполнена путем однократного введения через операционный доступ в правый шейный лимфатический узел 1% раствора λ -карагинана (Sigma-Aldrich, США) в объеме 20 мкл/животное (независимо от массы тела) [7]. λ -карагинан представляет собой группу неразветвленных сульфатированных полисахаридов, молекулы которых построены из остатков производных D-галактопиранозы со строгим чередованием α -1,3- и β -1,4-связей между ними.

Для исключения возможного влияния анестезии или оперативного вмешательства на исследуемые параметры в эксперимент была включена группа ложнооперированных животных, которым проводили операцию с доступом к лимфатическим узлам и последующим ушиванием раны без введения индуктора воспаления.

Выраженность воспалительной реакции у животных регистрировали через 72 часа после индукции. Для этого проводили гематологический анализ крови с помощью анализатора Mythic 18 Vet (Orphee, Швейцария), определяли уровень фактора некроза опухоли (TNF α) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА, Cloud-Clone Corp., США) и оценивали гистологически выраженность воспаления в шейных лимфатических узлах. Эвтаназию животных проводили в CO₂-камере в условиях постепенно-

го заполнения камеры диоксидом углерода с последующим обескровливанием из полостей сердца [2].

Имудон® вводили внутривентриально с помощью металлического зонда в виде суспензии таблеточной массы, приготовленной в дистиллированной воде, по лечебно-профилактической схеме ежедневно в течение 14 дней до индукции лимфаденита и 3 дней после индукции (всего 17 дней) в трех дозах: 0,73; 2,2 (эквивалентная терапевтической дозе для человека в пересчете на крысу) и 6,6 мг/кг в одинаковом объеме 5 мл/кг для всех доз. В контрольной группе животные получали внутривентриально дистиллированную воду в аналогичном объеме.

Моделирование пневмококковой пневмонии у мышей

В качестве возбудителя пневмонии использовали *S. pneumoniae* тип 3 (ATCC 6303, США). Индукцию пневмонии выполняли путем однократного интраназального введения с помощью шприца Гамильтона 1710RN 100 мкл (Hamilton Company Inc., США) суспензии бактерий *S. pneumoniae* в дозе 5×10^5 бактерий/животное в 50 мкл фосфатно-солевого буфера.

Имудон® вводили внутривентриально с помощью металлического зонда в виде суспензии таблеточной массы, приготовленной в дистиллированной воде, ежедневно в течение 14 дней до заражения и 5 дней после него (всего 19 дней) в трех дозах: 1,48; 4,44 (эквивалентная терапевтической дозе для человека в пересчете на мышшь) и 13,32 мг/кг. Все дозы вводили животным в одинаковом объеме 6,6 мл/кг. Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду в аналогичном объеме.

Оценку защитного действия препарата Имудон® и его влияния на специфический иммунный ответ проводили через 5 суток после заражения по выживаемости животных, выраженных в процентах, титру специфических IgA в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) и титру *S. pneumoniae* в гомогенате легких. Также был проведен гистологический анализ легких.

Через пять суток после заражения животных вводили в наркоз путем внутримышечной инъекции смеси Золетила (20-40 мг/кг) и Ксилазина (6-9 мг/кг). Отбор БАЛ осуществляли из левого легкого в стерильные пробирки. После отбора БАЛ животные были эвтаназированы путем обескровливания из полостей сердца. Правое легкое забирали для дальнейшего гистологического анализа и определения бактериальной нагрузки. Образцы БАЛ центрифугировали при 300 g в течение 15 минут при комнатной температуре. Супернатант замораживали и хранили

при температуре -80°C для дальнейшей оценки титра IgA.

Титр специфических IgA определяли с помощью иммуноферментного анализа [14]. Планшеты покрывали суспензией термически инактивированных (при температуре 56°C в течение 30 минут) *S. pneumoniae* тип 3 (10^7 КОЕ/мл) и оставляли на ночь при температуре 4°C . После блокирования неспецифических сайтов связывания фосфатно-солевым буфером, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина, в лунки планшетов вносили образцы БАЛ в двукратных разведениях. Планшеты с образцами инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C . После отмывки в лунки планшетов вносили вторичные козы антитела против IgA мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Novus, США). После инкубации с антителами в течение 1 часа планшеты промывали и во все лунки добавляли субстрат тетраметилбензидин (Thermo Scientific, США). По окончании инкубации вносили 0,1 М H_2SO_4 . Оптическую плотность измеряли с помощью планшетного спектрофотометра xMark (BioRad, США) при длине волны 450 нм. Вычисляли предел обнаружения (ПО) методики. За титр принимали то разведение образцов, при котором полученное значение ближе всего к ПО, а следующее за ним разведение было ниже ПО.

Для оценки титра *S. pneumoniae* образец левого легкого гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора Даунса в 1 мл фосфатно-солевого буфера. Из полученного нативного препарата готовили десятикратные разведения. Далее из нативного препарата и полученных разведений делали высевы на чашки Петри с Колумбийским агаром с добавлением 5% дефибрированной бараньей крови. Рост колоний оценивали через 48 часов.

Гистологический анализ

Материал для гистологического исследования фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов, после чего заливали в парафин [5]. Затем изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводили с помощью светооптического микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) при увеличении 50×, 100×, 200× и 400×. Микрофотографирование и морфометрию проводили с помощью цифровой фотокамеры AxioCam ICc 1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия).

С целью оценки развития шейного лимфаденита у крыс и влияния тестируемого препарата на микроструктуру лимфатических узлов про-

водили морфометрические измерения диаметра герминативных центров лимфоидных фолликулов и толщины капсулы лимфоузлов. Измерения проводили вручную, не менее чем в 5 полях зрения для всех показателей каждого образца. Лимфоидные фолликулы овальной формы измерялись по большему диаметру. Для расчетов использовались максимальные значения, полученные от каждого образца. Также проводили полуколичественную оценку степени и характера повреждений, выраженную в баллах от 0 до 3, по следующим показателям: нарушение структуры (гистиоархитектоники) лимфатического узла, наличие некротических повреждений, расширение и гистиоцитоз мозговых фолликулов [6].

Оценку воспаления легких у мышей, вызванного *S. pneumoniae*, проводили полуколичественно по степени и характеру повреждений, выраженную в баллах от 0 до 3, по следующим показателям: экссудат в просвете легких, гипертрофия эпителия бронхов, гиперплазия эпителия бронхов, некроз эпителия бронхов, экссудат в просвете бронхиол, гипертрофия бронхоальвеолярного эпителия, некроз бронхоальвеолярного эпителия, бронхит, перибронхит, бронхиолит, перибронхиолит, периваскулит, васкулит, интерстициальный инфильтрат, альвеолит, гиперемия альвеолярной перегородки, альвеолярная эмфизема, альвеолярные геморрагии.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, США). Для всех данных была применена описательная статистика. Данные проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Межгрупповые различия анализировали параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. Для оценки данных с признаками нормального распределения был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), с последующим межгрупповым сравнением (post hoc) с использованием теста Тьюки (post hoc Tukey's). Для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, для попарного сравнения экспериментальных групп использовали тест Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Модель лимфаденита у крыс, вызванная введением λ -каррагинана в шейный лимфатический узел, характеризовалась значимым увеличением общего количества лейкоцитов и гранулоцитов в крови (рис. 1), а также увеличением уровня про-

воспалительного цитокина TNF α в сравнении с ложнооперированными животными (рис. 2).

Внутрижелудочное введение Имудон® приводило к статистически значимому снижению уровня гранулоцитов крови по сравнению с контрольной группой животных. Так, тестируемый препарат в дозе 6,6 мг/кг снижал число гранулоцитов на 52% по сравнению с контролем, а в дозах 0,73 и 2,2 мг/кг (доза, эквивалентная терапевтической дозе для человека) — на 41 и 44% соответственно (рис. 1). Имудон® дозозависимым образом уменьшал концентрацию TNF α в сыворотке крови, при этом в дозах 2,2 и 6,6 мг/кг иммуномодулятор снижал уровень этого провоспалительного цитокина на 75 и 77% соответственно (рис. 2).

Местная воспалительная реакция после введения λ -каррагинана характеризовалась увеличением толщины капсулы пораженных лимфоузлов (рис. 3), а также нарушением гистиоархитектоники лимфатического узла, наличием некротических повреждений, расширением и гистиоцитозом мозговых фолликулов. Результаты полуколичественного анализа повреждений представлены на рисунке 4 в виде суммы баллов от каждого анализируемого признака. В некоторых случаях у оперированных крыс наблюдалось утолщение капсулы интактных лимфоузлов в основном за счет умеренной мононуклеарной инфильтрации, что обусловлено общей воспалительной реакцией прилежащих к операционному полю тканей. Диаметр герминативных центров лимфоидных фолликулов пораженного и интактного лимфоузла значимо не изменялся после введения λ -каррагинана. Имудон® дозозависимо снижал степень выраженности местной воспали-

тельной реакции, подавлял развитие лимфаденита и способствовал сохранению структуры и размеров лимфоидных фолликулов лимфатических узлов крыс (рис. 3).

Таким образом, Имудон® проявлял противовоспалительную активность на модели асептического шейного лимфаденита у крыс, которая выражалась в снижении общего числа лейкоцитов и гранулоцитов в крови, уровня TNF α в сыворотке крови и гистологических признаках местной воспалительной реакции.

Интраназальное введение суспензии *S. pneumoniae* в дозе 5×10^5 бактерий/животное приводило к развитию летальной пневмонии. Гибель мышей начали регистрировать на 3-и сутки после индукции патологии. В контрольной группе животных была зафиксирована гибель 60% животных через 5 дней (табл. 1). Среди мышей, получавших Имудон® в дозе 1,48 мг/кг, наблюдали смертность на уровне контрольной группы. Снижение уровня смертности в два раза наблюдали у животных, получавших тестируемый препарат в дозах 4,44 мг/кг (доза, эквивалентная терапевтической дозе для человека) и 13,32 мг/кг.

В группах животных, получавших Имудон® в дозах 4,44 и 13,32 мг/кг, отмечали статистически значимое снижение бактериальной нагрузки в легких по сравнению с контрольной группой (рис. 4), что согласуется с данными по снижению уровня гибели животных при введении иммуномодулятора в этих дозах.

У мышей контрольной группы с модельной патологией после введения суспензии бактерий отмечали микроскопическую картину воспаления в легких, вызванного заражением *S. pneumoniae*. Среди основных патологических

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИЗАТА НА ЛЕТАЛЬНОСТЬ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ЗАРАЖЕНИЯ *S. PNEUMONIAE*

TABLE 1. MORTALITY IN ANIMALS AFTER *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* INFECTION

Группа Group	Характеристика группы Group characteristics	Сутки после заражения Days after infection					Всего павших животных Total non-surviving animals
		1	2	3	4	5	
1	Интактная Healthy control	—	—	—	—	—	—
2	Контрольная группа Control	—	—	—	2	4	6 из 10 6 out of 10
3	Имудон® 1,48 мг/кг Imudon® 1.48 mg/kg	—	—	—	3	3	6 из 10 6 out of 10
4	Имудон® 4,44 мг/кг Imudon® 4.44 mg/kg	—	—	1	2	—	3 из 10 3 out of 10
5	Имудон® 13,32 мг/кг Imudon® 13.32 mg/kg	—	—	1	2	—	3 из 10 3 out of 10

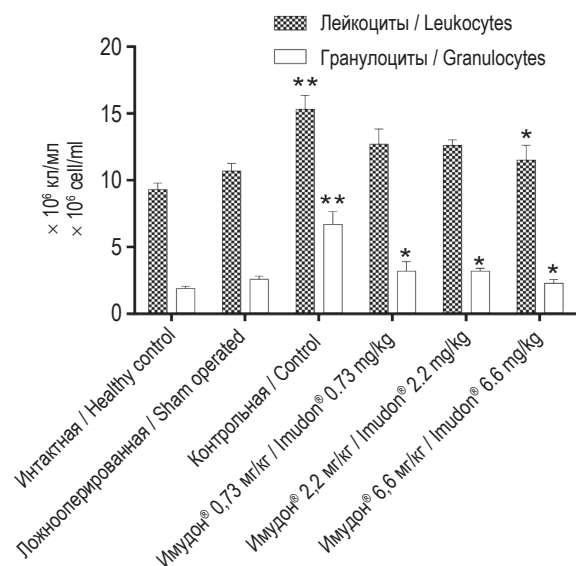


Рисунок 1. Влияние бактериального лизата на число лейкоцитов и гранулоцитов в крови через 3 дня после введения λ -каррагинана в шейный лимфатический узел крыс

Примечание. * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой; ** – $p < 0,05$ при сравнении с группой ложнооперированных животных.

Figure 1. Total leucocyte blood count and total granulocyte blood count in rats 3 days after the injection of λ -carrageenan into the right cervical lymph node

Note. *, differences are statistically significant compared to control group ($p < 0.05$); **, differences are statistically significant compared to the sham surgery group.

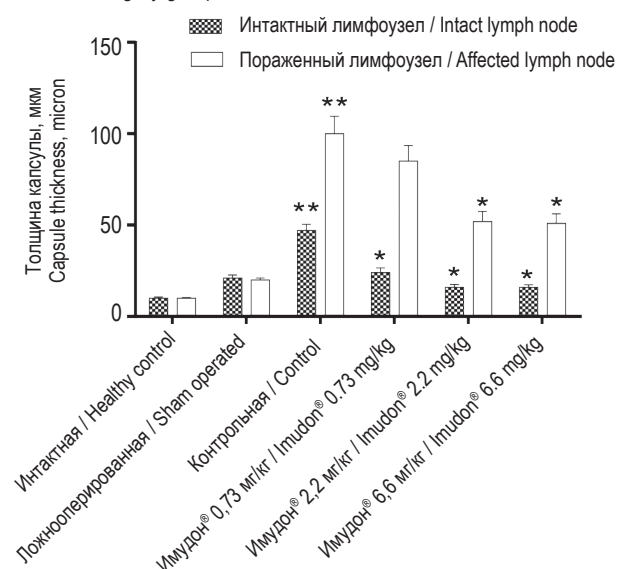


Рисунок 3. Влияние бактериального лизата на толщину капсулы интактного и пораженного лимфоузлов через 3 дня после введения λ -каррагинана

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Results of morphometric measurement of capsule thickness of intact and affected lymph nodes 3 days after the injection of λ -carrageenan

Note. As for Figure 1.

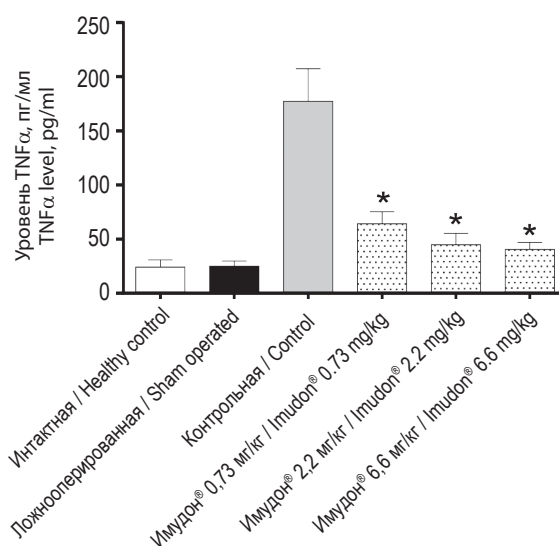


Рисунок 2. Влияние бактериального лизата на уровень TNF α в сыворотке крови через 3 дня после введения λ -каррагинана в шейный лимфатический узел крыс

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. TNF α level in rat serum 3 days after the injection of λ -carrageenan into the right neck lymph node

Note. As for Figure 1.

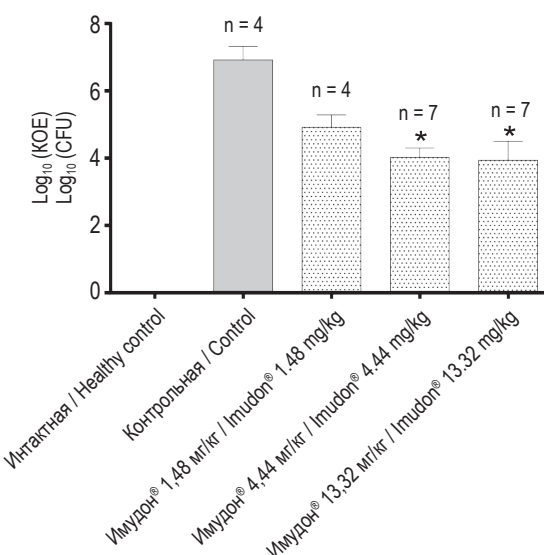


Рисунок 4. Влияние бактериального лизата на титр *S. pneumoniae* в образцах легкого через 5 дней после заражения

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 4. *Streptococcus pneumoniae* titre in right lung samples 5 days after infection

Note. As for Figure 1.

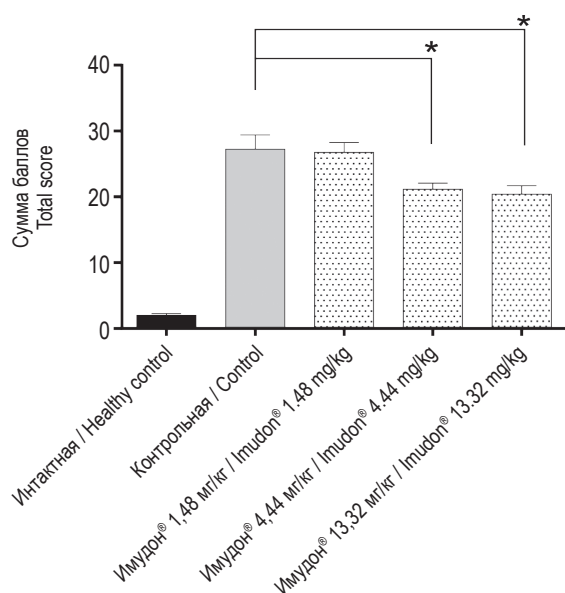


Рисунок 5. Влияние бактериального лизата на выраженность воспалительных изменений в легочной ткани у мышей через 5 дней после заражения *S. pneumoniae*

Примечание. См. примечание к рисунку 1. Данные представлены в виде суммы баллов на каждое животное по всем анализируемым показателям.

Figure 5. Bacterial lysate effects on inflammatory changes severity in the mice lung tissue 5 days after *S. pneumoniae* infection.

Note. As for Figure 1. Presented as the total score for each animal by all parameters.

изменений, выраженность которых оценивали в баллах, в тканях легких инфицированных животных следует выделить гипертрофию эпителия бронхов, гипертрофию бронхоальвеолярного эпителия, бронхит, перибронхит, бронхиолит, перибронхиолит, периваскулит, интерстициальный инфильтрат, альвеолит, гиперемию альвеолярной перегородки, альвеолярные геморрагии и эмфизему. С целью удобства представления данных и получения материала, пригодного для математической обработки, баллы всех показателей для каждого животного суммировали.

Микроскопический анализ легких выявил способность препарата Имудон® в дозах 4,44 и 13,32 мг/кг снижать воспалительный процесс, вызванный введением суспензии *S. pneumoniae* (рис. 5), что согласуется с вышеописанным снижением титра бактерий в легких на фоне применения препарата в этих же дозах.

Курсовое лечебно-профилактическое введение препарата Имудон® увеличивало титр IgA, специфических к *S. pneumoniae*. В группах животных, получавших тестируемый препарат в дозе 13,32 мг/кг, отмечено статистически значимое

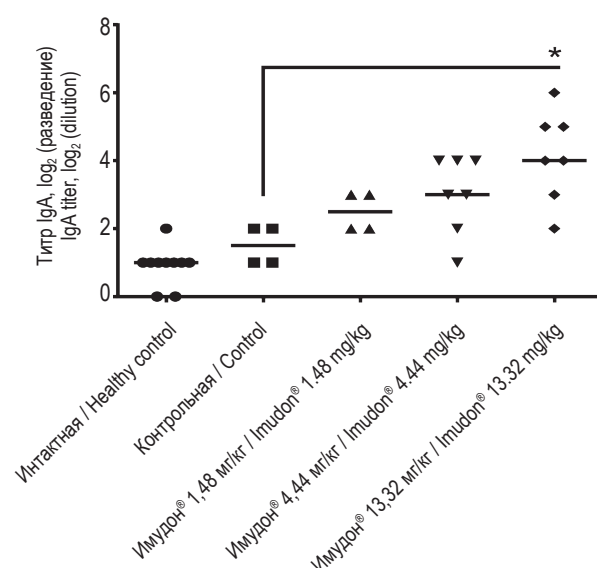


Рисунок 6. Влияние бактериального лизата на титр IgA, специфических к *S. pneumoniae*, у мышей через 5 дней после заражения *S. pneumoniae*

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 6. Bacterial lysate effects on *S. pneumoniae* specific IgA titer in bronchoalveolar lavage of mice 5 days after *S. pneumoniae* infection.

Note. As for Figure 1.

увеличение концентрации антипневмококковых IgA по сравнению с контрольной группой (рис. 6).

Таким образом, на модели воспаления легких, вызванного *S. pneumoniae*, подтверждены протективные свойства Имудон®, отчасти обусловленные стимулированием адаптивного иммунного ответа: увеличением титра специфических IgA.

Обсуждение

В клинической практике таблетки Имудон® рассасывают (не разжевывая) в полости рта. Поскольку у крыс и мышей в эксперименте данный путь введения воспроизвести весьма сложно, а также с учетом того, что значительная часть компонентов препарата в результате рассасывания *a priori* проглатывается вместе со слюной, в данном исследовании был использован внутрижелудочный способ введения Имудон® животным, широко применяемый для оценки фармакологической активности системно действующих бактериальных лизатов [4, 13, 14]. С целью достижения максимальной эффективности в работе выбран лечебно-профилактический способ вве-

дения животным препарата Имудон®. Этот вариант применения иммуномодулятора, во-первых, не противоречит инструкции по медицинскому применению Имудон®, а во-вторых, довольно часто встречается на практике, когда непосредственно на фоне превентивного курса все-таки развивается то или иное воспалительное заболевание, требующее лечения. Дозы для животных выбирали исходя из терапевтической дозы для человека в пересчете на кг массы тела и с учетом общепринятых метаболических коэффициентов [12].

Ключевое значение при пероральном применении лизатов имеет доставка бактериальных АГ и МАМП к М-клеткам пейеровых бляшек кишечника. Именно эти клетки являются первыми клеточными мишенями пероральных лизатов. Далее М-клетки обеспечивают трансцеллюлярный транспорт АГ и паттернов дендритным клеткам пейеровых бляшек, которые, в свою очередь, активируются и представляют бактериальные АГ для Т- и В-лимфоцитов либо в самих бляшках, либо в брыжеечных лимфатических узлах. Миграция АГ-примированных В-клеток и, возможно, нагруженных бактериальными АГ дендритных клеток из кишечника в дыхательные пути приводит к стимуляции выработки секреторных sIgA (иммунная солидарность слизистых) [4, 17].

Для препаратов топического действия механизм иммунной стимуляции является схожим, но происходит непосредственно на месте их первичного введения в организм. В этом отношении бактериальный лизат в форме назального спрея (ИРС® 19) действует в первую очередь на носоглоточную миндалину, а в форме таблеток при рассасывании (Имудон®) — на небные и язычную миндалины, а также протоки слюнных желез, открытые для экзогенных воздействий [4].

Иммуностимулятор, полученный в результате разрушения бактериальных клеток, содержит большое число как АГ, так и МАМП, благодаря чему способен не только индуцировать/активировать адаптивный ответ против бактерий и антигенов, которые входят в состав препарата, но и потенцировать иммунологические механизмы защиты от этих и множества других патогенов, принадлежащих самым разнообразным таксономическим группам. МАМП обладают плейотропным стимулирующим действием в отношении эффекторов врожденного иммунитета (нейтрофилов, моноцитов/макрофагов, дендритных клеток, лимфоцитов врожденного иммунитета) и, кроме того, выполняют роль адъювантов, то есть усиливают адаптивный (АГ-специфический) ответ [4]. Так, например, препарат ОМ-85, содержащий только бактериальные лизаты, был высоко эффективен на модели инфекции, вызванной

вирусом грипп А/PR/8/34H1N1, у мышей [9] и потенцировал действие амоксицилина на модели хронического ринусинусита, вызванного плесневым грибом *Aspergillus fumigatus* [18].

В настоящей работе на модели пневмонии, вызванной *S. pneumoniae* (возбудителем, компоненты которого не содержатся в составе исследуемого бактериального лизата), показаны протективные свойства препарата Имудон®, которые, по крайней мере отчасти можно объяснить установленным в настоящей работе потенцированием выработки антипневмококковых IgA.

При моделировании асептического воспаления шейного лимфатического узла в качестве локального индуктора использовали известный провоспалительный агент небактериальной природы — λ-каррагинан. В результате был воспроизведен не только лимфаденит, но и системный воспалительный ответ. Лимфаденит (острый и хронический) часто сопровождает вирусные инфекции дыхательных путей и ротоглотки, острые и хронические формы бактериальных тонзиллофарингитов, в том числе стрептококковой природы, заболевания зубов и полости рта [8]. В настоящей работе Имудон®, вводимый внутривнутрижелудочно, проявлял противовоспалительное действие как непосредственно в пораженном лимфоузле, так и на системном уровне, снижая концентрацию циркулирующего TNFα и общее количество лейкоцитов в крови.

Эти данные согласуются с результатами зарубежных экспериментальных и клинических исследований, в которых показано, что препараты на основе бактериальных лизатов обладают противовоспалительной и иммуномодулирующей активностью при заболеваниях, напрямую не связанных с бактериальной инфекцией: например, при астме [19], аллергическом рините [13], атопическом дерматите [10], остром бронхите, который обычно вызывают вирусы [16], а также при таких многофакторных заболеваниях, как хроническая обструктивная болезнь легких [11].

Особенностью препарата Имудон®, отличающей его от других бактериальных лизатов, является то, что он содержит смесь лизатов не только бактерий, наиболее часто вызывающих воспалительные заболевания полости рта и глотки, но и комменсалов — представителей рода *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. helveticus*, *L. fermentum*. Вероятно, именно с этим связаны дополнительные противовоспалительные свойства Имудон®, зарегистрированные в ряде клинических исследований, такие как быстрая регрессия боли, гиперемии и других признаков воспаления у пациентов с тонзиллофарингитами и заболеваниями полости рта. Предположительно в терапевтическую и профи-

лактическую эффективность препарата Имудон® вносит вклад синергизм входящих в его состав МАМП бактерий и грибов – агонистов рецепторов врожденного иммунитета [4].

Заключение

На модели асептического лимфаденита у крыс, вызванного λ -каррагинаном, продемонстрирована противовоспалительная активность Имудон®, которая выражалась в снижении общего числа лейкоцитов и гранулоцитов в крови, уровня циркулирующего TNF α и гистологических признаков местной воспалительной реакции. На модели

пневмонии у мышей, вызванной *S. pneumoniae*, подтверждены протективные свойства Имудон® и выявлена его способность увеличивать титр антипневмококковых IgA в БАЛ. Это подтверждает то, что спектр иммуномодулирующего действия препарата Имудон® выходит за рамки тех патогенов, компоненты которых входят в состав этого бактериального лизата. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о высокой противовоспалительной и иммуномодулирующей активности Имудон® и уточняют механизмы ранее описанных клинических эффектов этого препарата при воспалительных заболеваниях различной природы [4].

Список литературы / References

1. Блохин Б.М., Стешин В.Ю. Место лизатов бактерий OM-85 (Бронхо-Мунал) в профилактике и лечении респираторных заболеваний у детей // Практическая пульмонология, 2016. № 2. С. 29-34. [Blokhnin B.M., Steshin V.Yu. Bacterial lysates OM-85 (Broncho-Munal) for prevention and treatment of respiratory infections in children. *Prakticheskaya pulmonologiya = Practical Pulmonology*, 2016, no. 2, pp. 29-34. (In Russ.)]
2. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. [Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes].
3. Калюжин О.В. OM-85 в профилактике/лечении респираторных инфекций и обострений хронических заболеваний легких: критерии выбора, механизмы и доказательства // Лечащий врач, 2018. № 3. С. 77-82. [Kalyuzhin O.V. OM-85 in the prevention/treatment of respiratory infections and exacerbations of chronic lung diseases: selection criteria, mechanisms and evidence. *Lechashchiy Vrach = Attending Physician*, 2018, no. 3, pp. 77-82. (In Russ.)]
4. Калюжин О.В. Топические бактериальные лизаты в профилактике и лечении респираторных инфекций // Практическая медицина, 2016. № 2 (94). С. 69-74. [Kalyuzhin O.V. Topical bacterial lysates in the prevention and treatment of respiratory infections. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2016, no. 2 (94), pp. 69-74. (In Russ.)]
5. Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гушин Я.А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных // Международный вестник ветеринарии, 2014. № 2. С. 103-108. [Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Gushin Ya.A. Features histological processing of organs and tissues of laboratory animals. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine*, 2014, no. 2, pp. 103-108. (In Russ.)]
6. Мужикян А.А., Ходько С.В., Гушин Я.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Гистологические изменения в лимфатических узлах крыс при моделировании острого шейного лимфаденита // Международный вестник ветеринарии, 2017. № 1. С. 75-83. [Muzhikyan A.A., Khodko S.V., Gushin Ya.A., Makarova M.N., Makarov V.G. Histological changes in the lymph nodes of rats in modeling acute cervical lymphadenitis. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine*, 2017, no. 1, pp. 75-83. (In Russ.)]
7. Тесакова С.В., Самусенко И.А., Карачинская И.В., Крышень К.Л., Абрашова Т.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Экспериментальная модель шейного лимфаденита у крыс для оценки противовоспалительной эффективности препаратов // Профилактическая и клиническая медицина, 2011. № 1 (38). С. 57-62. [Tesakova S.V., Samusenko I.A., Karachinskaya I.V., Kryshen K.L., Abrashova T.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Experimental model of cervical lymphadenitis in rats to evaluate the efficacy of anti-inflammatory medicines. *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina = Preventive and Clinical Medicine*, 2011, no. 1 (38), pp. 57-62. (In Russ.)]
8. Челябин Э.А., Завьялов А.Е., Куринский В.В., Важжов И.В. Шейный лимфаденит как междисциплинарная проблема // Научный альманах, 2017. № 1-3. С. 256-260. [Cheliabin E.A., Zavyalov A.E., Kurinsky V.V., Vazhzhov I.V. Cervical lymphadenitis as interdisciplinary problem. *Nauchnyy almanakh = Scientific Almanac*, 2017, no. 1-3, pp. 256-260. (In Russ.)]
9. Bessler W.G., vor dem Esche U., Masihi N. The bacterial extract OM-85 BV protects mice against influenza and Salmonella infection. *Int. Immunopharmacol.*, 2010, Vol. 10, no. 9, pp. 1086-1090.
10. Bodemer C., Guillet G., Cambazard F., Boralevi F., Ballarini S., Milliet C., Bertuccio P., la Vecchia C., Bach J.F., de Prost Y. Adjuvant treatment with the bacterial lysate (OM-85) improves management of atopic dermatitis: A randomized study. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 3, e0161555. doi: 10.1371/journal.pone.0161555.
11. Cazzola M. A new bacterial lysate protects by reducing infectious exacerbations in moderate to very severe COPD: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Trends in Medicine*, 2006, Vol. 6, no. 3, pp. 191-199.

12. Guidance for Industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers: Pharmacology and toxicology. 2005. 30 p.
13. Han L., Zheng C.P., Sun Y.Q., Xu G., Wen W., Fu Q.L. A bacterial extract of OM-85 Broncho-Vaxom prevents allergic rhinitis in mice. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2014, Vol. 28, no. 2, pp. 110-116.
14. Hvalbye B.K., Aaberge I.S., Løvik M., Haneberg B. Intranasal immunization with heat-inactivated *Streptococcus pneumoniae* protects mice against systemic pneumococcal infection. *Infect. Immun.*, 1999, Vol. 67, no. 9, pp. 4320-4325.
15. Lewandowski A., Christine M.D., Myers M.J. λ -Carrageenan initiates inflammation via activation of heterodimers TLR2/6 and TLR4/6. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, Suppl. 1, 42.12.
16. Orcel B., Delclaux B., Baud M., Derenne J.P. Oral immunization with bacterial extracts for protection against acute bronchitis in elderly institutionalized patients with chronic bronchitis. *Eur. Respir J.*, 1994, Vol. 7, pp. 446-452.
17. Rojy A., Chorostowska-Wynimko J. Bacterial immunostimulants-mechanism of action and clinical application in respiratory diseases. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2008, Vol. 76, no. 5, pp. 353-359.
18. Tao Y., Yuan T., Li X., Yang S., Zhang F., Shi L. Bacterial extract OM-85 BV protects mice against experimental chronic rhinosinusitis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, Vol. 8, no. 6, pp. 6800-6806.
19. Zhong H., Wei J., Yao Y., Fu R., Li H., Fu Q., Wen W. A bacterial extract of OM-85 Broncho-Vaxom suppresses ovalbumin-induced airway inflammation and remodeling in a mouse chronic allergic asthma model. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2017, Vol. 10, no. 2, pp. 1149-1157.

Авторы:

Крышень К.Л. — к.б.н., старший научный сотрудник, руководитель исследований АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

Кухаренко А.Е. — к.фарм.н., менеджер по доклинической безопасности, отдел глобальных доклинических разработок ООО «Эбботт Лэбораториз», Москва, Россия

Вичаре Абхиджит С. — магистр ветеринарных наук, старший менеджер по токсикологии Abbott Healthcare Pvt. Ltd, промышленный район Марол, Восточный Андхери, Мумбаи, Индия

Гайдай Е.А. — биолог ООО «Институт доклинических исследований», п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

Крышень А.А. — руководитель лаборатории микробиологии ООО «Институт доклинических исследований», п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

Authors:

Kryshen K.L., PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Director, Home of Pharmacy JSC, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

Kukharensko A.E., PhD (Pharmacology), Preclinical Safety Manager, Global Preclinical Development Department, Abbott Laboratories LLC, Moscow, Russian Federation

Vichare Abhijit S. — Master (Veterinary Sciences), Senior Toxicology Manager, Abbott Healthcare Pvt. Ltd, Marol Industrial Area, Andheri East, Mumbai, India

Gaidai E.A., Biologist, Institute of Pre-clinical Research Ltd, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

Kryshen A.A., Head, Microbiology Laboratory, Institute of Pre-clinical Research Ltd, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

Гущин Я.А. — руководитель отдела гистологии и патоморфологии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», п. Кузьмолровский, Ленинградская обл., Россия

Gushchin Ya.A., Head, Department of Histology and Pathology, Home of Pharmacy JSC, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

Калюжнин О.В. — д.м.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Kalyuzhin O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology and Allergy, Faculty of Medicine, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Макарова М.Н. — д.м.н., директор АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», п. Кузьмолровский, Ленинградская обл., Россия

Makarova M.N., PhD, MD (Medicine), Director, Home of Pharmacy JSC, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

Макаров В.Г. — д.м.н., профессор, заместитель директора по науке ООО «Институт доклинических исследований», п. Кузьмолровский, Ленинградская обл., Россия

Makarov V.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director, Institute of Pre-clinical Research Ltd, Kuzmolovsky Village, Leningrad Region, Russian Federation

Махадеван Бринда — к.м.н., старший научный сотрудник департамента глобальных доклинических разработок, Abbott Healthcare Pvt. Ltd, промышленный район Марол, Восточный Андхери, Мумбаи, Индия

Mahadevan Brinda, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Abbott Healthcare Pvt. Ltd, Marol Industrial Area, Andheri East, Mumbai, India

Поступила 25.04.2019
Отправлена на доработку 06.05.2019
Принята к печати 21.05.2019

Received 25.04.2019
Revision received 06.05.2019
Accepted 21.05.2019

СПОНТАННЫЙ И ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ПАТОГЕНЕЗЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА

Луговая А.В.¹, Калинина Н.М.^{1,2}, Митрейкин В.Ф.¹, Эмануэль Ю.В.¹,
Ковальчук Ю.П.¹, Артемова А.В.¹

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

² ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Апоптоз является ведущим механизмом деструкции β -клеток поджелудочной железы при сахарном диабете 1 типа (СД-1). При исследованиях маркеров апоптоза мононуклеаров периферической крови с целью уточнения роли программируемой клеточной смерти в патогенезе различных заболеваний более значимой считается оценка активационного апоптоза в ответ на стимуляцию митогеном или специфическим антигеном, так как роль апоптоза в иммунном ответе возрастает в условиях активации клеток. Установлено, что стимулы, которые активируют покоящиеся Т-лимфоциты, инициируют апоптотическую гибель активированных Т-лимфоцитов. Поэтому определение только спонтанного апоптоза мало информативно. Кроме того, определение чувствительности клеток к индукции апоптоза дает возможность выявить связь патологического процесса с усилением или ослаблением этой чувствительности. Ключевым моментом в инициации СД-1 является устойчивость к апоптозу активированных аутореактивных Т-лимфоцитов, которые мигрируют из кровяного русла в поджелудочную железу и принимают активное участие в деструкции инсулярного аппарата поджелудочной железы. Несмотря на длительное изучение патогенеза СД-1, точные причины резистентности клонов эффекторных Т-клеток к апоптозу остаются неясными. Не установлены факты, дающие ответ на вопрос: насколько способность Т-лимфоцитов периферической крови вступать в апоптоз ассоциирована с тяжестью и продолжительностью заболевания. В связи с этим целью исследования явилась оценка эффективности активационного апоптоза лимфоцитов периферической крови больных СД-1 в зависимости от состояния компенсации и длительности течения заболевания. Были изучены особенности индукции активационного апоптоза в культуре мононуклеаров периферической крови у больных сахарным диабетом 1 типа. В качестве индукторов были использованы фитогемагглютинин (ФГА) и инсулин. Выявлена повышенная чувствительность мононуклеаров периферической крови больных СД-1 к активационному апоптозу *in vitro*. Максимальный апоптотический ответ на ФГА был отмечен при декомпенсации СД-1. Принимая во внимание, что в ответ на стимуляцию ФГА апоптозу подвергаются преимущественно Т-клетки, можно говорить о высокой чувствительности

Адрес для переписки:

Луговая Анна Владимировна
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого,
6-8, корп. 11.
Тел.: 8 (921) 315-97-48.
E-mail: g89213159748@gmail.com

Address for correspondence:

Lugovaya Anna V.
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg, L. Tolstoy str.,
6-8, bldg 11.
Phone: 7 (921) 315-97-48.
E-mail: g89213159748@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Луговая, Н.М. Калинина, В.Ф. Митрейкин,
Ю.В. Эмануэль, Ю.П. Ковальчук, А.В. Артемова
«Спонтанный и индуцированный апоптоз
мононуклеаров периферической крови в патогенезе
сахарного диабета 1 типа» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 123–134.
doi: 10.15789/1563-0625-SAA-1834

© Луговая А.В. и соавт., 2020

For citation:

A.V. Lugovaya, N.M. Kalinina, V.Ph. Mitreikin,
Yu.V. Emanuel, Yu.P. Kovalchuk, A.V. Artyomova
“Spontaneous and activation-induced apoptosis of peripheral
blood mononuclear cells in the pathogenesis of type 1 diabetes
mellitus”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 123–134.
doi: 10.15789/1563-0625-SAA-1834

DOI: 10.15789/1563-0625-SAA-1834

сти активированных Т-лимфоцитов больных СД-1 к индукции апоптоза. Самый высокий уровень активационного апоптоза в ответ на стимуляцию инсулином был выявлен при компенсации СД-1. Установлено, что интенсивность спонтанного и индуцированного апоптоза мононуклеаров периферической крови больных СД-1 коррелирует с состоянием декомпенсации углеводного обмена и степенью нарушения секреторной функции β -клеток поджелудочной железы. Это подтверждается наличием выраженной прямой корреляционной связи между процентом гиподиплоидных клеток и концентрацией глюкозы в крови и обратной зависимостью между количеством апоптотических клеток и содержанием С-пептида в сыворотке крови. Полученные данные находятся в соответствии с современной концепцией иммунопатогенеза СД-1, согласно которой развитие аутоиммунных заболеваний связано не только с усиленным апоптозом клеток-мишеней, но и с дефектом фагоцитарного клиренса апоптотических клеток вследствие нарушения эффероцитоза — фагоцитоза апоптотических клеток. Таким образом, максимальное повышение уровня спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови при декомпенсации СД-1 объясняется не только влиянием гипергликемии, но и вторичным иммунным ответом на так называемые «поздние апоптотические» или «вторичные некротические» β -клетки вследствие их неэффективного фагоцитарного клиренса.

Ключевые слова: апоптоз, Т-лимфоциты, фитогемагглютинин, инсулин, сахарный диабет 1 типа, С-пептид, β -клетки

SPONTANEOUS AND ACTIVATION-INDUCED APOPTOSIS OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN THE PATHOGENESIS OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Lugovaya A.V.^a, Kalinina N.M.^{a,b}, Mitreikin V.Ph.^a, Emanuel Yu.V.^a, Kovalchuk Yu.P.^a, Artyomova A.V.^a

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

^b A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Apoptosis is the leading mechanism of pancreatic β -cell destruction in type 1 diabetes mellitus (T1DM). Assessment of activation apoptosis in response to stimulation with mitogen or a specific antigen is considered more significant when studying apoptosis markers in peripheral blood mononuclear cells to clarify the role of programmed cell death in pathogenesis of various diseases, since the role of apoptosis in immune response is increased in activated cells. It has been established that the stimuli that activate resting T lymphocytes initiate apoptotic death of activated T lymphocytes. Therefore, detection of spontaneous apoptosis only is not very informative. In addition, determination of cell sensitivity to apoptosis induction makes it possible to identify relations of pathological process to the enhancement or weakening of this sensitivity. The key point in the T1DM initiation is apoptosis resistance of activated autoreactive T lymphocytes, that migrate from bloodstream to the pancreas and take an active part in destruction of the pancreatic insular structures. Despite long studies of T1DM pathogenesis, the exact causes of resistance of effector T cell clones to apoptosis remain unclear. There are no facts that answer the question: to what extent is the ability of T lymphocytes of peripheral blood to enter into apoptosis associated with severity and duration of the disease. In this regard, the aim of the study was to evaluate the effectiveness of *in vitro* activation-induced apoptosis of T lymphocytes in the patients with T1DM, depending on the state of compensation and duration of the disease. The features of activation-induced apoptosis have been studied in cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the patients with T1DM. Phytohemagglutinin (PHA) and insulin were used as apoptosis inducers. Increased *in vitro* sensitivity of PBMC to activation-induced apoptosis was revealed in T1DM patients. The strongest apoptotic response to PHA was detected in cases of T1DM decompensation. Considering predominantly T cells to undergo apoptosis in response to PHA stimulation, one may speak about high sensitivity of activated T lymphocytes to induced apoptosis in the patients with T1DM. The highest level of activation-induced apoptosis in response to insulin stimulation was revealed in the compensation phase of T1DM. We have found that the intensity of spontaneous and activation-induced apoptosis correlates with decompensation of the disease and the degree of β -cells secretory function disorder. In fact, strong direct correlation was observed between the percentage

of hypodiploid cells and blood concentration of glucose, and the inverse correlation was shown between the number of apoptotic cells and serum levels of C-peptide. The data obtained are in accordance with the modern concept of T1DM immunopathogenesis, which includes a development of autoimmune diseases associated not only with enhanced apoptosis of target cells, but also with a defect in phagocytic clearance of apoptotic cells due to impaired efferocytosis, i.e., phagocytosis of apoptotic cells. Thus, the maximal increase in spontaneous and activation-induced apoptosis levels of peripheral blood lymphocytes during the DM-1 decompensation is explained not only by the hyperglycemia effects, but also by the secondary immune response to the so-called “late apoptotic” or “secondary necrotic” β -cells, due to their ineffective phagocytic clearance.

Keywords: *apoptosis, T lymphocytes, phytohaemagglutinin, insulin, type 1 diabetes mellitus, C-peptide, β -cell*

Введение

В патогенезе сахарного диабета 1 типа (СД-1) с апоптозом связаны 2 основных механизма: 1) нарушение процессов апоптоза в тимусе, приводящее к неэффективной селекции аутореактивных Т-лимфоцитов; 2) роль апоптоза как завершающего механизма иммунообусловленной деструкции β -клеток. Аутореактивные лимфоциты, устойчивые к апоптозу, мигрируют из кровяного русла в орган-мишень — поджелудочную железу и образуют воспалительные инфильтраты — инсулиты [26, 29]. Иммунокомпетентные клетки, инфильтрирующие островковую ткань, продуцируют провоспалительные цитокины (фактор некроза опухоли α (TNF α), интерферон- γ (IFN γ) и интерлейкин-1 β (IL-1 β)), индуцибельную NO-синтазу (iNOS) с последующим образованием оксида азота (NO), избыточное количество свободных радикалов и другие соединения, вызывающие гибель β -клеток по механизму апоптоза [15, 26, 31]. Активированные цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), входящие в состав инсулитов, осуществляют выброс цитотоксических гранул: перфорины, гранзимы А и гранзима В, которые представляют собой сериновые протеазы [30]. Перфорин доставляет гранзимы в клетку-мишень, где они активируют различные виды программированной клеточной смерти (ПКС): апоптоз, некроптоз или некроз (при истощении клеточной АТФ) [16, 19, 24, 30, 32]. Гранзим А индуцирует каспазозависимый апоптоз клетки-мишени. Гранзим В, напротив, инициирует каспазозависимый механизм апоптоза, активируя расщепление эффекторных каспаз (каспаза-3, -6, -7) и их субстратов, в том числе PARP-1 (Poly ADP-Ribose Polymerase 1 — поли(АДФ-рибоза) полимеразы 1, которая является ранним сенсором повреждения ДНК [8, 13, 16, 18]. Новейшие экспериментальные исследования показали, что при моделировании Th1-опосредованного аутоиммунного диабета у мышей основная часть трансплантированных им β -клеток погибает в результате некроза, индуцированного аутореактивными Т-клетками. Вклад апоптоза и некроптоза в гибель островкового аппарата при оттор-

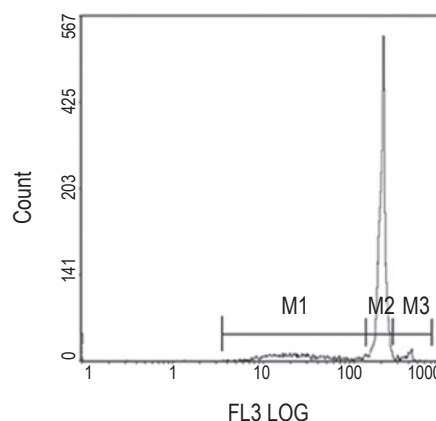


Рисунок 1. ДНК-гистограмма, полученная при цитометрическом анализе культуры мононуклеаров периферической крови здорового человека

Примечание. M1 – зона расположения гиподиплоидных клеток; M2 – зона расположения диплоидных клеток; M3 – зона расположения тетраплоидных клеток.

Figure 1. DNA histogram obtained by cytometric analysis of the culture of peripheral blood mononuclear cells of a healthy person

Note. M1, the area of hypodiploid cells; M2, the area of diploid cells; M3, the area of tetraploid cells.

жении трансплантата оказался ничтожным [34]. В то же время последние исследования, проведенные на клеточной линии островков поджелудочной железы человека EndoC- β H1, доказывают ключевую роль апоптоза в гибели островков Лангерганса [21]. В настоящий момент большинство авторов считают апоптоз ведущим механизмом деструкции инсулярного аппарата поджелудочной железы [10, 17, 21, 25].

При клинико-иммунологических обследованиях пациентов более значимой считается оценка активационного апоптоза в ответ на стимуляцию митогеном или специфическим антигеном, так как роль апоптоза в иммунном ответе возрастает в условиях активации клеток, когда он выступает в качестве процесса, альтернативного пролиферации [3, 4, 9]. Определение чувствительности клеток к индукции апоптоза дает возможность выявить связь патологического процесса с усилением или ослаблением этой чувствительности [4,

9]. Для определения готовности Т-лимфоцитов к активационному апоптозу в качестве индуктора используют фитогемагглютинин (ФГА), так как он является преимущественно Т-клеточным митогеном и дает возможность судить об апоптотической активности именно Т-клеток [4, 9]. В наших предыдущих исследованиях мы показали значение атерогенных липопротеинов как «эндогенных» индукторов апоптоза у больных острым коронарным синдромом (ОКС) [1, 2, 7]. Нами было установлено, что окисленные липопротеины низкой плотности индуцируют Fas-опосредованный апоптоз как мононуклеаров периферической крови, так и эндотелиоцитов коронарных сосудов, что свидетельствует о системном характере апоптоза при ОКС [1, 7]. Усиление апоптоза эндотелия приводило к поступлению в кровь значительного количества микровезикул эндотелиального происхождения и увеличению прокоагулянтной активности крови за счет экспрессии на их поверхности фосфатидилсерина, что говорит о существенной роли апоптоза эндотелиоцитов в патогенезе тромбофлебии при атеросклерозе [2, 7]. Это подтверждает актуальность исследований роли индукторов апоптоза в пато-

генезе не только сахарного диабета, но и диабетических микро- и макроангиопатий [22, 33].

Ключевым моментом в инициации СД-1 является устойчивость к апоптозу активированных аутореактивных Т-лимфоцитов, которые мигрируют из кровяного русла в поджелудочную железу и принимают активное участие в деструкции β -клеток. Несмотря на длительное изучение патогенеза СД-1, точные причины резистентности клонов эффекторных Т-клеток к апоптозу остаются неясными. Не установлены факты, дающие ответ на вопрос: насколько способность Т-лимфоцитов периферической крови вступать в апоптоз ассоциирована с тяжестью и продолжительностью заболевания. В связи с этим представляется актуальной оценка эффективности активационного апоптоза Т-лимфоцитов *in vitro* у больных СД-1 в зависимости от состояния компенсации и длительности течения заболевания.

Цель исследования — определить чувствительность мононуклеаров периферической крови больных СД-1 к активационному апоптозу в ответ на стимуляцию ФГА и инсулином через 144 часа культивирования *in vitro* и сопоставить с уровнем глюкозы и С-пептида в крови.

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ С-ПЕПТИДА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА (СД-1)

TABLE 1. SERUM LEVEL OF C-PEPTIDE IN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS (T1DM)

Группы обследуемых лиц Groups of examined persons	Характеристика обследуемых лиц Characteristics of the examined persons	Число обследуемых лиц Number of examined persons (n)	С-пептид (нг/мл) C-peptide (ng/ml)
I группа I group	Здоровые лица Healthy persons	n = 30	2,0
IIa группа IIa group	Состояние декомпенсации, впервые выявленный СД-1 The state of decompensation, newly diagnosed T1DM	n = 17	0,24**
IIб группа IIb group	Состояние декомпенсации, средняя продолжительность СД-1 составляет 15,3±5,1 года The state of decompensation, the average duration of the T1DM is 15.3±5.1 years	n = 19	0,05***
IIIa группа IIIa group	Состояние компенсации, средняя продолжительность СД-1 составляет 0,6±0,2 года The state of compensation, the average duration of the T1DM is 0.6±0.2 years	n = 13	0,49**
IIIб группа IIIb group	Состояние компенсации, средняя продолжительность СД-1 составляет 15,1±5,4 года The state of compensation, the average duration of the T1DM is 15.1±5.4 years	n = 14	0,08***

Примечание. ** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,01$); *** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,001$).

Note. **, differences in the studied indicator with the control group are statistically significant ($p < 0.01$); ***, differences in the studied indicator with the control group are statistically significant ($p < 0.001$).

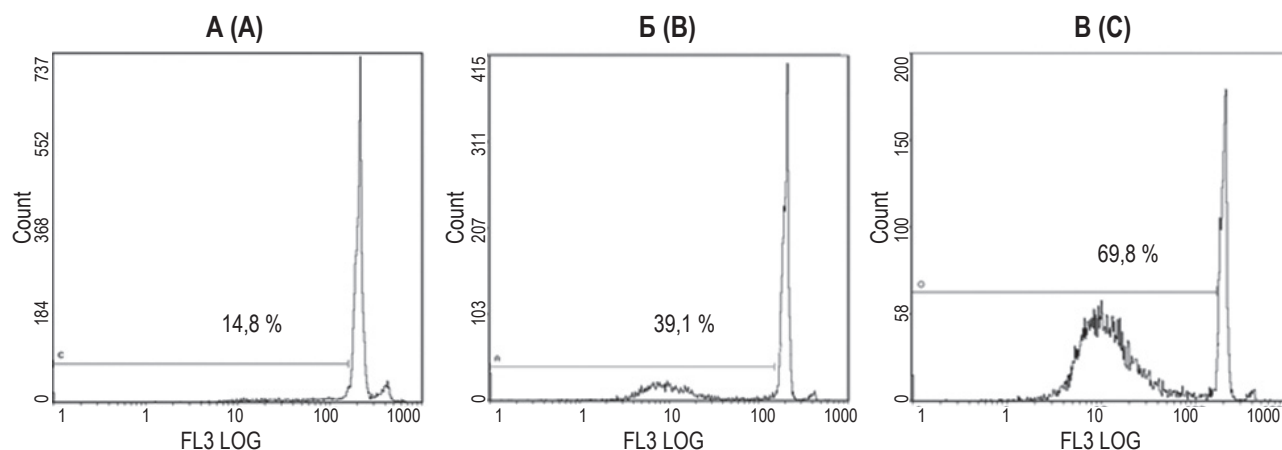


Рисунок 2. Гистограммы, иллюстрирующие количество (%) гиподиплоидных клеток в культуре мононуклеаров периферической крови в ответ на стимуляцию ФГА через 144 часа культивирования в контрольной группе (А), в группе больных сахарным диабетом 1 типа (СД-1) в состоянии компенсации углеводного обмена (Б), в группе больных СД-1 в состоянии декомпенсации углеводного обмена (В)

Figure 2. Histograms illustrating the number (%) of hypodiploid cells in the culture of peripheral blood mononuclear cells in response to stimulation of PHA after 144 hours of cultivation in the control group (A), in the group of patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) in the state of compensation of carbohydrate metabolism (B), in the group patients with T1DM in a state of decompensation of carbohydrate metabolism (C)

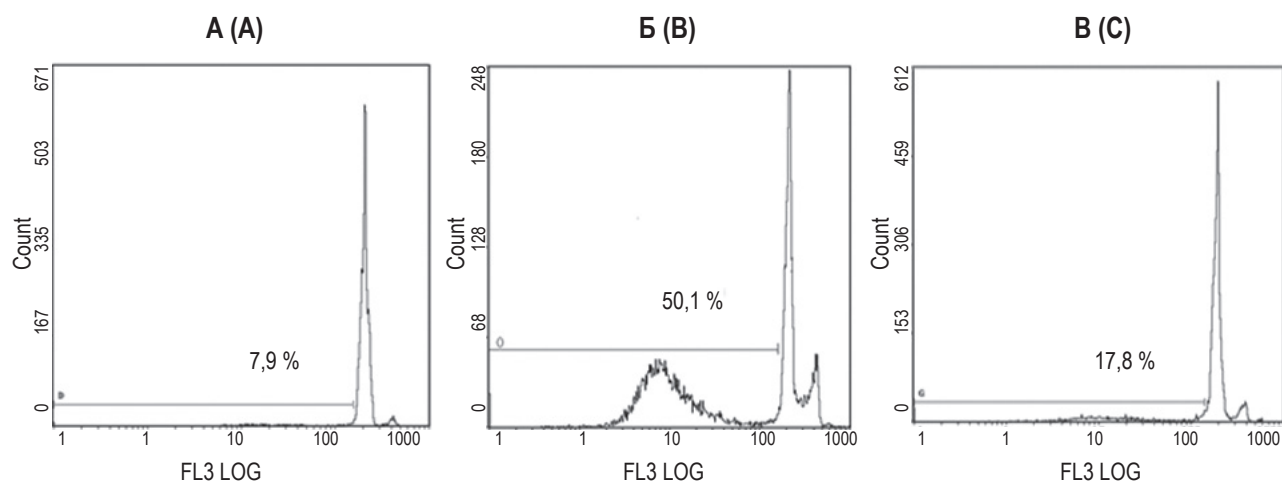


Рисунок 3. Гистограммы, иллюстрирующие количество (%) гиподиплоидных клеток в культуре мононуклеаров периферической крови в ответ на стимуляцию инсулином через 144 часа культивирования в контрольной группе (А), в группе больных сахарным диабетом 1 типа (СД-1) в состоянии компенсации углеводного обмена (Б), в группе больных СД-1 в состоянии декомпенсации углеводного обмена (В)

Figure 3. Histograms illustrating the number (%) of hypodiploid cells in the culture of peripheral blood mononuclear cells in response to stimulation of insulin after 144 hours of cultivation in the control group (A), in the group of patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) in the state of compensation of carbohydrate metabolism (B), in the group patients with T1DM in a state of decompensation of carbohydrate metabolism (C)

Материалы и методы

Характеристика обследуемых групп больных

Было обследовано 63 больных с достоверно установленным диагнозом «СД-1». Контрольную группу (I группа) составили 30 здоровых лиц, по полу и возрасту сопоставимых с больными СД-1. Распределение больных по группам про-

водилось в зависимости от состояния компенсации углеводного обмена и длительности течения заболевания. II группу (декомпенсированный СД-1) составили 17 больных с впервые выявленным СД-1 (IIa группа) и 19 пациентов с длительностью течения СД-1 в среднем $15,3 \pm 5,1$ года (IIб группа). На момент постановки диагноза концентрация глюкозы в крови у пациентов груп-

пы Па составила в среднем $16,3 \pm 2,2$ ммоль/л. В группе Пб уровень гипергликемии составил в среднем $17,1 \pm 1,5$ ммоль/л. В III группу (состояние компенсации СД-1) были включены 13 больных с длительностью заболевания до 1 года, средняя продолжительность заболевания которых составила $0,6 \pm 0,2$ года (IIIа группа), и 14 человек с продолжительностью СД-1 в среднем $15,1 \pm 5,4$ года (IIIб группа). На момент исследования уровень глюкозы в группах IIIа и IIIб составил в среднем $3,9 \pm 1,9$ ммоль/л и $4,1 \pm 1,6$ ммоль/л соответственно.

Определение процента гиподиплоидных клеток

Об уровне спонтанного и индуцированного апоптоза судили по процентному содержанию гиподиплоидных клеток, выявляемых методом проточной ДНК-цитометрии. Гиподиплоидия является следствием утраты в процессе апоптоза части хроматина [4, 6, 12]. В основе метода лежит взаимодействие красителя этидиум бромида с ДНК апоптотических клеток, после чего исследуемые образцы подвергают проточной цитометрии. Процент клеток во фракции, соответствующей гиподиплоидному содержанию ДНК, характеризует апоптотические процессы [12]. Фракция апоптотических клеток (M1) располагается левее основного пика (M2), соответствующего диплоидным клеткам на гистограмме (рис. 1).

Для активации мононуклеаров использовали ФГА в конечной концентрации 10 мкг/мл и человеческий рекомбинантный инсулин («Моно-тард НМ», Ново Нордиск, Дания) в трех различных концентрациях: 1,75 мкг/мл, 3,5 мкг/мл и 7,0 мкг/мл. Концентрация инсулина 3,5 мкг/мл была утверждена как оптимальная в результате серии начальных экспериментов. Для изучения спонтанного апоптоза использовали клеточные культуры без добавления индукторов. Оценку апоптоза осуществляли сразу после выделения клеток (спонтанный апоптоз), а также через 24, 72 и 144 ч культивирования в CO_2 -инкубаторе. Сроки инкубации были выбраны в соответствии с литературными данными [5, 9, 29], согласно которым у здоровых лиц апоптотический ответ на стимуляцию ФГА достигает своего максимума на 6–7 сутки.

Проточная ДНК-цитометрия

По окончании инкубации в анализируемые образцы добавляли 10 мкл РНК-азы, 8 мкл раствора этидиума бромида (1 мг/мл) и анализировали на проточном цитометре EPICS XL (Beckman Coulter, США). Анализ ДНК-гистограмм проводили в программе Multigraph (Beckman Coulter), с помощью которой осуществляли подсчет процента гиподиплоидных клеток.

Оценка секреторной функции β -клеток

Количественное определение С-пептида в сыворотке крови проводили методом твердофазного

иммуноферментного анализа с использованием тест-системы, производимой фирмой Diagnostic System Laboratories (США).

Статистический анализ результатов

Для статистической обработки полученных данных использовали непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни для сравнения средних, корреляционный анализ по Спирмену. Обработка материала проведена с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft, США, Windows XP).

Результаты

Результаты определения содержания С-пептида в сыворотке крови больных СД-1 представлены в таблице 1.

Как следует из представленных в таблице 1 данных, во всех группах обследуемых пациентов уровень С-пептида был снижен по сравнению с контрольной группой (I группа). Достоверное снижение С-пептида по сравнению с группой контроля ($p < 0,01$) наблюдалось уже на ранних сроках заболевания (группы IIа и IIIа). Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что клиническая манифестация СД-1 происходит после разрушения 80–90% островков Лангерганса [26, 31]. Наиболее выраженное снижение секреторной функции β -клеток было выявлено при длительности течения СД-1 более 15 лет (группы IIб и IIIб). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что содержание С-пептида изменялось независимо от состояния компенсации углеводного обмена и было ассоциировано с продолжительностью заболевания.

Результаты оценки спонтанного и индуцированного апоптоза в культуре мононуклеаров периферической крови *in vitro* представлены в таблице 2. Во всех группах обследуемых лиц наибольший апоптотический ответ на ФГА и инсулин отмечался на 6 сутки культивирования. На рисунках 2 и 3 представлены гистограммы, иллюстрирующие процент гиподиплоидных клеток в культурах мононуклеаров на 6 сутки культивирования с ФГА и инсулином соответственно.

Как видно из данных, представленных в таблице 2, во всех группах обследованных больных СД-1 апоптотический ответ на стимуляцию ФГА был достоверно выше, чем в контрольной группе, и достигал максимальных значений у больных в состоянии декомпенсации с длительностью заболевания более 15 лет (IIб группа). Полученные данные свидетельствуют о повышенной чувствительности мононуклеаров больных СД-1 к активационному апоптозу, более выраженной при декомпенсации углеводного обмена (IIа и IIб группы). Принимая во внимание, что в ответ

TABLE 2. NUMBER (%) OF HYPODIPLOID CELLS CHARACTERIZING THE INTENSITY OF SPONTANEOUS AND INDUCED APOPTOSIS OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS (T1DM)

Группы Groups	% гиподиплоидных клеток % hypodiploid cells									
	0 часов 0 hours	24 часа 24 hours		72 часа 72 hours		144 часа 144 hours				
	Спонтанный апоптоз Spontaneous apoptosis	Индucedированный апоптоз Induced apoptosis		Спонтанный апоптоз Spontaneous apoptosis	Индucedированный апоптоз Induced apoptosis		Спонтанный апоптоз Spontaneous apoptosis	Индucedированный апоптоз Induced apoptosis		
ФГА 10 мкг/мл PHA 10 µg/ml		ИНС 3,5 мкг/мл INS 3.5 µg/ml	ФГА 10 мкг/мл PHA 10 µg/ml		ИНС 3,5 мкг/мл INS 3.5 µg/ml	ФГА 10 мкг/мл PHA 10 µg/ml		ИНС 3,5 мкг/мл INS 3.5 µg/ml		
I	1,4	3,9	8,2	5,2	4,7	12,1	6,2	6,5	15,6	8,0
IIa	5,1*	9,4*	20,1*	8,9	17,3**	39,8*	10,7	30,1**	59,4**	18,6*
IIб IIb	6,2*	14,1*	22,8**	7,8	23,5**	46,8**	9,4	35,8*	66,9**	16,1*
IIIa	1,9	5,1	16,3*	11,8*	6,8	24,9*	19,1*	10,9	39,8*	30,2**
IIIб IIIb	1,6	5,8	17,0*	12,1*	7,3	26,1*	16,4*	9,8	36,2*	29,5**

Примечание. * – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,05$); ** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,01$). ФГА – фитогемагглютинин, ИНС – инсулин.

Note. *, differences in the studied indicator with the control group are statistically significant ($p < 0.05$); **, differences in the studied indicator with the control group are statistically significant ($p < 0.01$). PHA, phytohemagglutinin; INS, insulin.

на стимуляцию ФГА апоптозу подвергаются преимущественно Т-клетки [4, 9], можно говорить о высокой чувствительности активированных Т-лимфоцитов больных СД-1 к индукции апоптоза.

Уровень спонтанного апоптоза при СД-1 изменялся в зависимости от состояния компенсации углеводного обмена. При компенсированном СД-1 (IIIa и IIIб группы) процент гиподиплоидных клеток в контрольной пробе (без добавления индукторов) был сопоставим с контрольной группой. У больных с гипергликемией (IIa и IIб группы) достоверное повышение процента гиподиплоидных клеток по сравнению с больными в состоянии компенсации СД-1 (IIIa и IIIб группы) и контрольной группой (I группа) наблюдалось сразу после выделения клеток (0 часов инкубации), что позволяет предположить наличие зависимости между уровнем гликемии и интенсивностью спонтанного апоптоза у больных СД-1. Согласно данным литературы, хроническая гипергликемия индуцирует р53-опосредованный апоптоз клеток-мишеней, который реализуется через активацию эффекторной каспазы-3 [11, 28].

У больных СД-1 было выявлено достоверное повышение апоптотического ответа на инсулин по сравнению с контрольной группой (табл. 2). Установлено, что инсулин не является митогеном, однако он предотвращает возвращение в состояние покоя клеток, предварительно простимулированных митогенами [5, 23]. У больных СД-1 лимфоциты *in vivo* преактивированы аутоантигенами поджелудочной железы [29], что может объяснить их более высокий апоптотический ответ на инсулин по сравнению с контрольной группой.

При декомпенсации углеводного обмена дополнительным стимулирующим активацию лимфоцитов фактором является гипергликемия, которая способна индуцировать активационный апоптоз лимфоцитов путем усиления экспрессии на их мембране Fas-рецептора и рецептора фактора некроза опухоли 1 типа (TNFR1 — Tumor Necrosis Factor Receptor 1) [26, 29]. Возможно, это объясняет высокий уровень спонтанного апоптоза у больных СД-1 в состоянии декомпенсации (табл. 2). Добавление в клеточную культуру инсулина способствует повышению утилизации клетками глюкозы и, вероятно, ингибированию апоптоза, индуцированного гипергликемией. Это объясняет уменьшение количества гиподиплоидных клеток в культуральной среде в ответ на введение инсулина по сравнению с уровнем спонтанного апоптоза при декомпенсации, наблюдаемое на протяжении всего периода культивирования (табл. 2).

Как показано на рисунке 3Б, максимальный апоптотический ответ на инсулин был отмечен при компенсации углеводного обмена (IIIa и IIIб группы). Согласно данным литературы, у больных в состоянии компенсации СД-1 культивирование лимфоцитов с инсулином *in vitro* значительно повышало их чувствительность к анти-Fas IgM-индуцированному апоптозу [29]. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что при СД-1 адекватно подобранная доза инсулина способствует не только достижению нормогликемии *in vivo*, но и элиминации аутореактивных Т-лимфоцитов путем апоптоза.

У больных СД-1 была выявлена прямая корреляционная зависимость между уровнем спонтанного и индуцированного ФГА апоптоза мононуклеаров и содержанием глюкозы в крови ($r = 0,76$; $p < 0,01$ и $r = 0,81$; $p < 0,01$ соответственно) и обратная зависимость между уровнем спонтанного и индуцированного апоптоза и концентрацией С-пептида в сыворотке крови ($r = -0,68$; $p < 0,05$ и $r = -0,75$; $p < 0,01$ соответственно). Менее сильная прямая корреляционная зависимость была установлена между процентом контрольных и стимулированных инсулином гиподиплоидных клеток и концентрацией глюкозы ($r = 0,59$; $p < 0,05$ и $r = 0,61$; $p < 0,01$ соответственно) и обратная связь между уровнем спонтанного и индуцированного апоптоза мононуклеаров и содержанием С-пептида в крови ($r = -0,62$; $p < 0,01$ и $r = -0,58$; $p < 0,05$ соответственно). Таким образом, выраженность спонтанного и индуцированного апоптоза мононуклеаров периферической крови больных СД-1 коррелирует с состоянием декомпенсации заболевания и степенью нарушения секреторной функции β -клеток.

Обсуждение

Анализируя полученные данные, отметим, что они находятся в соответствии с современной концепцией иммунопатогенеза СД-1, согласно которой развитие аутоиммунных заболеваний связано с усиленным апоптозом клеток-мишеней и дефектом фагоцитарного клиренса апоптотических клеток [13, 14]. В основе этих заболеваний лежит нарушение эффероцитоза — фагоцитоза апоптотических клеток [13, 14, 18, 20].

Повышение чувствительности Т-лимфоцитов к индукции апоптоза, усиление спонтанного и индуцированного апоптоза мононуклеаров периферической крови при СД-1, наблюдаемое в нашем исследовании, может быть объяснено их предсуществующей активацией аутоантигенами, главным образом апоптотическими β -клетками, неэффективный клиренс которых индуцирует дополнительное воспаление и аутоиммунитет [14, 18, 20, 31]. Избыточное накопление ДНК апопто-

тических клеток вследствие их несвоевременного удаления и/или усиления скорости апоптоза клеток-мишеней приводит к дополнительному срыву аутоотолерантности и воспалению, в том числе за счет избыточного локального синтеза триады провоспалительных цитокинов — $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ и $\text{IFN}\gamma$, известных своими проапоптогенными свойствами [15, 20]. Данная комбинация цитокинов реализует программу апоптотической гибели β -клеток через активацию транскрипционных факторов JNK (с-Jun N-terminal kinase — с-Jun N-концевая киназа), NF- κ B (Nuclear Factor of κ -chain В lymphocytes — ядерный фактор каппачеи В-лимфоцитов) и STAT-1 (Signal Transducers and Activators of Transcription — проводники сигналов и активаторы транскрипции), стимулирующих синтез iNOS с последующим образованием NO. Этот механизм апоптоза β -клеток является универсальным при СД-1, независимо от продолжительности заболевания и состояния компенсации углеводного обмена [26, 30, 31].

Гипергликемия, являясь мощным индуктором апоптоза практически в любых тканях, в том числе в островковой ткани поджелудочной железы, помимо цитокин-опосредованного апоптоза, инициирует апоптотическую гибель β -клеток за счет индукции окислительного и метаболического стресса, ER-стресса (стресса эндоплазматического ретикулаума), избыточной генерации ROS (активных форм кислорода), повышения экспрессии гликопротеина CD36 (Fatty Acid Transporter Protein — белок-переносчик жирных

кислот), непосредственно участвующего в клеточно-опосредованном апоптозе β -клеток [11, 28]. Согласно данным последних экспериментальных исследований, хроническая гипергликемия не только вызывает устойчивую активацию сигнального каскада Rac1 (Ras-связанный субстрат 1, малый G-белок) $\rightarrow$ Nox2 (НАДФН оксидаза 2) $\rightarrow$ p38MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа p38) $\rightarrow$ p53 $\rightarrow$ caspase-3 с реализацией апоптоза β -клеток по митохондриальному пути, но и увеличивает скорость апоптоза β -клеток, что приводит к нарушению их эффероцитоза [11, 28, 31]. Таким образом, полученные нами результаты о максимальном повышении спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови при декомпенсации СД-1 объясняются не только влиянием гипергликемии, но и вторичным иммунным ответом на так называемые «поздние апоптотические» или «вторичные некротические» β -клетки вследствие их неэффективного фагоцитарного клиренса [27, 31].

Благодарности

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов и выражают благодарность за сотрудничество коллективу эндокринологического отделения Елизаветинской городской больницы и сотрудникам лаборатории клеточного и гуморального иммунитета Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никитина г. Санкт-Петербурга за предоставление базы для обследования пациентов.

Список литературы / References

1. Васина Л.В., Иванов Г.А., Луговая А.В., Морозова Л.Ю. Изменение циркулирующих CD59^+ -лимфоцитов периферической крови при остром коронарном синдроме // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета, 2008. № 1. С. 6-12. [Vasina L.V., Ivanov G.A., Lugovaya A.V., Morozova L.Yu. Change of content of circulating CD59^+ cells of peripheral blood at acute coronary syndrome. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of St. Petersburg State University*, 2008, no. 1, pp. 6-12. (In Russ.)]
2. Васина Л.В., Луговая А.В., Петрищев Н.Н., Серебряная Н.Б. Патогенетическое значение изменения относительного содержания аннексин V^+ -мононуклеаров и CD59^+ -лимфоцитов периферической крови при остром коронарном синдроме // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях, 2008. № 1. С. 74-80. [Vasina L.V., Lugovaya A.V., Petrishev N.N., Serebryanaya N.B. Pathogenic significance of relative alteration in V-binding mononuclears and CD59^+ lymphocytes of peripheral blood in patients with acute coronary syndrome. *Mediko-biologicheskie i sotsialno-psikhologicheskie problemy bezopasnosti v chrezvychaynykh situatsiyakh = Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situation*, 2008, no. 1, pp. 74-80. (In Russ.)]
3. Зурочка А.В., Давыдова Е.В., Альтман Д.А. Интенсивность процессов апоптоза и пролиферации лимфоцитов в условиях дислипидемии при ранних формах хронической ишемии мозга // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 27-34. [Zurochka A.V., Davydova E.V., Altman D.A. Intensity of apoptotic and proliferative events in lymphocytes under dyslipidemic conditions at early stages of chronic brain ischemia. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 27-34. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-27-34.
4. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudriavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in biomedical research]. Ekaterinburg: RIO UB RAS, 2018. 720 p.

5. Иммунология: в 3-х т. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. У. Пола. М.: Мир, 1988. 476 с. [Fundamental Immunology. Ed. William E. Paul, M.D]. Moscow: Mir, 1988. 476 p.
6. Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 6. С. 461-482. [Kudriavtsev I.V., Golovkin A.S., Zurochka A.V., Khaidukov S.V. Modern technologies and approaches to apoptosis studies in experimental biology. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 6, pp. 461-482. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-6-461-482.
7. Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Луговая А.В. Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексин V-связанных апоптотических клеток в крови больных острым коронарным синдромом // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета, 2008. № 1. С. 14-24. [Petrishchev N.N., Vasina L.V., Lugovaya A.V. Content of soluble markers of apoptosis and circulating V annexin-connected apoptotic cells in the blood of patients with acute coronary syndrome. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo universiteta* = *Bulletin of St. Petersburg State University*, 2008, no. 1, pp. 14-24. (In Russ.)]
8. Хаитов Р.М. Иммунология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 496 с. [Khaitov R.M. Immunology: textbook]. Moscow: GEOTAR-Media, 2018. 496 p.
9. 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, importance of its evaluation in immunopathological states. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2000, Vol. 2, no. 1, pp. 7-16. (In Russ.)]
10. Ardestani A., Maedler K. MST1: a promising therapeutic target to restore functional beta cell mass in diabetes. *Diabetologia*, 2016, Vol. 59, no. 9, pp. 1843-1849.
11. Baidwan S., Chekuri A., Hynds D.L., Kowluru A. Glucotoxicity promotes aberrant activation and mislocalization of Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 [Rac1] and metabolic dysfunction in pancreatic islet β -cells: reversal of such metabolic defects by metformin. *Apoptosis*, 2017, Vol. 22, no. 11, pp. 1380-1393.
12. Banfalvi G. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*, 2017, Vol. 22, no. 2, pp. 306-323.
13. Birge R.B., Boeltz S., Kumar S., Carlson J., Wanderley J., Calianese D., Barcinski M., Brekken R.A., Huang X., Hutchins J.T., Freimark B., Empig C., Mercer J., Schroit A.J., Schett G., Herrmann M. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ.*, 2016, Vol. 23, pp. 962-978.
14. Blander J.M. The many ways tissue phagocytes respond to dying cells. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 277, no. 1, pp. 158-173.
15. Brozzi F., Nardelli T.R., Lopes M., Millard I., Barthson J., Mariana I., Grieco A.F., Villate O., Oliveira J.M., Casimir M., Bugliani M., Engin F., Hotamisligil G.S., Marchetti P., Eizirik D.L. Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. *Diabetologia*, 2015, Vol. 58, no. 10, pp. 2307-2316.
16. Elmore S.A., Dixon D., Hailey J.R., Harada T., Herbert R.A., Maronpot R.R., Nolte T., Rehg J.E., Rittinghausen S., Rosol T.J., Satoh H., Vidal J.D., Willard-Mack C.L., Creasy D.M. Abstract Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group. *Toxicol. Pathol.*, 2016, Vol. 44, no. 2, pp. 173-188.
17. Fu D., Yu J.Y., Yang S., Wu M., Hammad S.M., Connel A. R., Du M., Chen J., Lyons T. J. Survival or death: a dual role for autophagy in stress-induce pericyte loss in diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 2016, Vol. 59, no. 10, pp. 2251-2261.
18. Garg A.D., Romano E., Rufo N., Agostinis P. Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anticancer therapy mechanisms and clinical translation. *Cell Death Differ.*, 2016, Vol. 23, pp. 938-951.
19. Green D.R. Cell death and the immune system: getting to how and why. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 277, no. 1, pp. 4-8.
20. Green D.R., Oguin T.H., Martinez J. The clearance of dying cells: table for two. *Cell Death Differ.*, 2016, Vol. 23, pp. 915-926.
21. Hakonen E., Chandral V., Fogarty C.L., Yu N.Y., Ustinov J., Katayama S., Galli E., Danilova T., Lindholm P., Vartiainen A., Einarsdottir E., Krjutškov K., Kere J., Saarma M., Lindah M., Otonkoski T. MANF protects human pancreatic beta cells against stress-induced cell death. *Diabetologia*, 2018, Vol. 61, no. 10, pp. 2202-2214.
22. Hammes H.P. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. *Diabetologia*, 2018, Vol. 61, no. 1, pp. 29-38.
23. Kumagai J., Akiyama H., Iwashita S., Iida H., Yahara I. *In vitro* regeneration of resting lymphocytes from stimulated lymphocytes and its inhibition by insulin. *J. Immunol.*, 1981, Vol. 126, no. 4, pp. 1249-1254.
24. Pasparakis M., Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 2015, Vol. 517, pp. 311-320.
25. Purwana I., Liu J.J., Portha B., Buteau J. HSF1 acetylation decreases its transcriptional activity and enhances glucolipotoxicity-induced apoptosis in rat and human beta cells. *Diabetologia*, 2017, Vol. 60, no. 8, pp. 1432-1441.
26. Ryan A., Murphy M., Godson C., Hickey F.B. Diabetes mellitus and apoptosis: inflammatory cells. *Apoptosis*, 2009, Vol. 14, no. 12, pp. 1435-1450.
27. Sachet M., Liang Y.Y., Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis*, 2017, Vol. 22, no. 10, pp. 1189-1204.

28. Sidarala V., Kowluru A. Exposure to chronic hyperglycemic conditions results in Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1)-mediated activation of p53 and ATM kinase in pancreatic β -cells. *Apoptosis*, 2017, Vol. 22, no. 5, pp. 597-607.
29. Tchorzewski H., Glowacka M., Banasik P., Lewkowicz M., Szalapska-Zawodniak M. Activated T lymphocytes from patients with high risk of type I diabetes mellitus have different ability to produce interferon- γ , interleukin-6 and interleukin-10 and undergo anti-CD95 induced apoptosis after insulin stimulation. *Immunol. Lett.*, 2001, Vol. 75, pp. 225-234.
30. Thomas H.E., Trapani J.A., Kay T.W.H. The role of perforin and granzymes in diabetes. *Cell Death Differ.*, 2010, Vol. 17, pp. 577-585.
31. Vives-Pi M., Rodriguez-Fernandez S., Pujol-Autonell I. How apoptotic β -cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review. *Apoptosis*, 2015, Vol. 20, no. 3, pp. 263-272.
32. Weinlich R., Oberst A., Beere H.M., Green D.R. Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2016, Vol. 18, pp. 127-136.
33. Zhang M., Zhang L., Hu J., Lin J., Tingting W., Duan Y., Man W., Feng J., Sun L., Jia H., Li C., Zhang R., Wang H., Sun D. MST1 coordinately regulates autophagy and apoptosis in diabetic cardiomyopathy in mice. *Diabetologia*, 2016, Vol. 59, no. 11, pp. 2435-2447.
34. Zhao Y., Scott N.A., Fynch S., Elkerbout L., Wong W.W., Mason K.D., Strasser A., Huang D.C., Kay T.W.H., Thomas H.E. Autoreactive T cells induce necrosis and not BCL-2-regulated or death receptor-mediated apoptosis or RIPK3-dependent necroptosis of transplanted islets in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2015, Vol. 58, no. 1, pp. 140-148.

Авторы:

Луговая А.В. — к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, врач клинической лабораторной диагностики отделения лабораторной диагностики клиники ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

Lugovaya A.V., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kalinina N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Leading Research Associate, Allergist-Immunologist, Main Research Associate, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Митрейкин В.Ф. — д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Эмануэль Ю.В. — к.м.н., врач-невролог, доцент кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного образования ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ковальчук Ю.П. — к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, заместитель главного врача отделения лабораторной диагностики клиники ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Артемова А.В. — врач-невролог, старший лаборант кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного образования ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Mitreikin V.Ph., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathological Physiology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Emanuel Yu.V., PhD (Medicine), Clinical Neurologist, Associate Professor, Department of Neurology and Manual Medicine, Faculty of Postgraduate Education, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kovalchuk Yu.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a course of Molecular Medicine, Deputy Head Physician, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Artyomova A.V., Clinical Neurologist, Senior Laboratory Assistant, Department of Neurology and Manual Medicine, Faculty of Postgraduate Education, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 18.07.2019
Принята к печати 27.09.2019

Received 18.07.2019
Accepted 27.09.2019

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА КОСТНОМОЗГОВЫЕ МОНОНУКЛЕАРЫ

Лыков А.П.^{1,2}, Суровцева М.А.^{1,2}, Повещенко О.В.^{1,2},
Чернявский А.М.², Фомичев А.В.², Бондаренко Н.А.^{1,2}, Ким И.И.^{1,2}

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

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

Резюме. Стволовые/прогениторные клетки, рассматриваемые как альтернативный способ терапии сердечной недостаточности, способствуют регенерации поврежденного миокарда при инфаркте миокарда. Эффективность клеточной терапии зависит от популяционного состава и функциональной активности клеточного трансплантата, а функциональная активность клеточного трансплантата, в свою очередь, зависит от условий микроокружения. Культивирование стволовых/прогениторных клеток с эритропоэтином стимулирует пролиферативный потенциал, устойчивость к гипоксии *in vitro*, а также стимулированию ангиогенеза *in vivo*. Проведено исследование влияния кратковременной инкубации костномозговых мононуклеаров (КМ-МНК) больных ишемической болезнью сердца (ИБС) с эритропоэтином на фенотип, клеточный цикл, апоптоз и пролиферативный потенциал. КМ-МНК выделяли из аспирата костного мозга больных ИБС на градиенте плотности, инкубировали в течение 60 минут с эритропоэтином (33,4 МЕ/мл). Методом проточной цитофлуориметрии показано, что в пуле КМ-МНК выявлены эндотелиальные прогениторные клетки, находящиеся на разных стадиях созревания и дифференцировки, мезенхимальные стволовые клетки, суммарное количество которых не превышает 30% от общего пула КМ-МНК. Кратковременная инкубация КМ-МНК с эритропоэтином снижает экспрессию «хоминг-рецептора» CD184 на CD34⁺ клетках и увеличивает экспрессию CD184 на CD31⁺ клетках в пуле КМ-МНК ($p < 0,05$). Кроме этого, показано, что эритропоэтин задерживает CD34⁺ клетки в фазе покоя (G0G1), уменьшает долю клеток в фазе синтеза (S) и митоза (G2/M) ($p < 0,05$) и не влияет на апоптоз по данным Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit. Эритропоэтин не оказывал существенного влияния на экспрессию КМ-МНК молекул, вовлеченных в обеспечение адгезии, таких как CD18, CD29, CD44, CD49a, CD54, CD62E, CD146 и CD202b. МТТ-методом показано, что кратковременная преинкубация КМ-МНК с эритропоэтином способствовала существенно снижению пролиферативной активности КМ-МНК ($p < 0,05$), но отмечена тенденция повышения резистентности предобработанных эритропоэтином КМ-МНК к окислительному стрессу, индуцированному перекисью водорода. Выявлена сопряженность эндотелиальных прогениторных клеток, находящихся на разных стадиях созревания и дифференцировки, с количеством гемопоэтических стволовых клеток в общем пуле КМ-МНК. На количество CD34⁺/CD133⁺, CD34⁺/CD31⁺, CD45⁺/EpoR⁺ и CD34⁺/EpoR⁺ в пуле КМ-МНК влияет возраст больных. Таким образом, кратковременная инкубация КМ-МНК с эритропоэтином способствует задержке клеток в фазе покоя клеточного цикла, что, в свою очередь, способствует снижению пролиферативного потенциала КМ-МНК.

Ключевые слова: эритропоэтин, костномозговые мононуклеары, фенотип, клеточный цикл, апоптоз, пролиферация

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.П. Лыков, М.А. Суровцева, О.В. Повещенко,
А.М. Чернявский, А.В. Фомичев, Н.А. Бондаренко,
И.И. Ким «Влияние эритропоэтина на костномозговые
мононуклеары» // Медицинская иммунология, 2020.
Т. 22, № 1. С. 135–142.
doi: 10.15789/1563-0625-EEO-1807
© Лыков А.П. и соавт., 2020

For citation:

A.P. Lykov, M.A. Surovtseva, O.V. Poveshchenko,
A.M. Chernyavsky, A.V. Fomichev, N.A. Bondarenko, I.I. Kim
“Effect of erythropoietin on bone marrow mononuclear cells”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 1, pp. 135–142.
doi: 10.15789/1563-0625-EEO-1807
DOI: 10.15789/1563-0625-EEO-1807

EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS

Lykov A.P.^{a, b}, Surovtseva M.A.^{a, b}, Poveshchenko O.V.^{a, b},
Chernyavsky A.M.^b, Fomichev A.V.^b, Bondarenko N.A.^{a, b}, Kim I.I.^{a, b}

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

^b E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Stem/progenitor cells are considered an alternative method of heart failure therapy by promoting regeneration of damaged myocardium in myocardial infarction. Effectiveness of cell therapy depends on the population composition and functional activity of the cell graft, and, in turn, it depends on the conditions of microenvironment. Cultivation of stem/progenitor cells with erythropoietin stimulates proliferative potential causing *in vitro* resistance to hypoxia, and *in vivo* stimulation of angiogenesis. We aimed for assessing effects of erythropoietin upon hematopoietic cells. We studied some effects of short-term incubation of bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs) in patients with coronary heart disease (CHD) with erythropoietin upon cellular phenotype, cell cycle, apoptosis and their proliferative potential. BM-MNCs were isolated from bone marrow aspirate from patients with CHD in a density gradient, then incubated for 60 minutes with erythropoietin (33.4 IU/ml). Using flow cytometric assay of the total BM-MNCs pool, we have shown there endothelial progenitor cells at different stages of maturation and differentiation, mesenchymal stem cells are. Their total number did not exceed 30%. Short-term incubation of BM-MNCs with erythropoietin reduces expression of CD184 "homing receptor" molecules on CD34⁺ cells, and causes increase of CD184 on CD31⁺ cells in the BM-MNCs pool ($p < 0.05$). In addition, erythropoietin has been shown to cause a delay of CD34⁺ cells in the resting phase (G0G1), reduce a proportion of cells in the synthetic phase (S) and mitosis (G2/M) ($p < 0.05$), and does not affect apoptosis, as shown by Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit. Erythropoietin had no significant effects on expression on BM-MNCs surface molecules involved in providing adhesion, such as CD18, CD29, CD44, CD49a, CD54, CD62E, CD146, and CD202b. MTT-method has shown that the short-term preincubation of BM-MNCs with erythropoietin contributed to a significant decrease in proliferative activity of BM-MNCs ($p < 0.05$). However, there was a tendency towards increased resistance of erythropoietin-pretreated BM-MNCs to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. We have also revealed a correlation between the numbers of endothelial progenitor cells at different stages of differentiation, and numbers of hematopoietic stem cells in the total BM-MNCs pool. The number of CD34⁺/CD133⁺, CD34⁺/CD31⁺, CD45⁺/EpoR⁺, and CD34⁺/EpoR⁺ in BM-MNCs pool are dependent on the age of patients. Hence, a short-term incubation of BM-MNCs with erythropoietin promotes the cells to be retained in resting phase of the cell cycle, thus, in turn, helping to reduce proliferative potential of BM-MNCs.

Keywords: erythropoietin, bone marrow, mononuclear cells, phenotype, cell cycle, apoptosis, proliferation

Введение

Стволовые/прогениторные клетки, рассматриваемые как альтернативный способ терапии сердечной недостаточности, способствуют регенерации поврежденного миокарда при инфаркте миокарда (ИМ) [15, 19]. Показано, что аутологичные костномозговые мононуклеары при ишемии миокарда способствуют улучшению сократительной функции левого желудочка сердца, как следствие ангиогенеза в миокарде, опосредованного эндотелиальными прогениторными клетками (ЭПК) костного мозга [16, 18]. Эффективность клеточной терапии зависит от популяционного состава и функциональной активности клеточного трансплантата, а функциональная активность клеточного трансплантата, в свою очередь, зависит от условий микроокружения в области пораженного миокарда [2, 5, 11]. Эри-

тропоэтин — гликопротеин, продуцируемый в основном клетками почек в ответ на гипоксию, стимулирует эритропоэз. При этом было показано наличие у эритропоэтина цитопротекторного влияния на неэритроидные клетки, обусловленное связыванием эритропоэтина с рецептором для эритропоэтина, экспрессируемым на клетках, и запуском RAS-митогенактивирующей протеинкиназы, Akt/фосфатидилинозитол-3-киназы, JAK-2 сигнального пути, STAT-5, GATA-1, GATA-2, NF-2 и NF-κB транскрипционных факторов. Антиапоптотический эффект эритропоэтина обусловлен активацией bcl-2, bcl-XL, блокадой каспаз 3, 7, 8, 9 и регуляцией активности проапоптотических генов bax, DP5 [1, 4]. Эритропоэтин увеличивает долю выживших клеток при гипоксии, а инкубация КМ-МНК с эритропоэтином подавляет апоптоз и стимулирует

пролиферацию эндотелиальных прогениторных клеток [4, 6, 8]. Однако как эритропоэтин влияет на поверхностные молекулы КМ-МНК у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС), исследовано недостаточно.

Целью настоящего исследования явилось установление влияния эритропоэтина на фенотип, клеточный цикл, апоптоз и пролиферацию костномозговых мононуклеаров.

Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 г. Материалом для исследования служили КМ-МНК больных ИБС с функциональным классом сердечной недостаточности по NYHA II-III класса (43 мужчины и у 7 женщин в возрасте 52-74 лет). КМ-МНК выделяли из аспирата костного мозга на градиенте плотности фиколл/верографин, инкубацию КМ-МНК с эритропоэтином (Рекормон, Швейцария, 33,4 МЕ/мл) проводили в культуральных флаконах в физиологическом растворе с добавлением 10% аутологичной сыворотки в течение 60 минут при 37 °С в CO₂-инкубаторе с последующей отмывкой. Фенотип КМ-МНК определяли методом проточной цитофлуориметрии на FASC Canto II (BD, США) с использованием моноклональных антител к CD31, CD34, CD45, CD184 (BD, США), CD73, CD90 (BioLegend, США), CD105 (eBioscience, США), CD133 (Abcam, США), а также рецептора 2 типа эндотелиального фактора роста (VEGFR-2/KDR, Novus Biologicals, США), а количество поверхностных молекул адгезии в гейте CD34⁺ клеток определяли с использованием моноклональных антител к CD18, CD29, CD44, CD49a, CD54, CD62E, CD146 (BD, США) и CD202b (BioLegend, США). Клеточный цикл КМ-МНК до и после экспозиции с эритропоэтином исследовали с использованием пропидиума иодида (BD, США), а апоптоз/некроз с использованием Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD, США). При анализе нахождения клеток в фазе клеточного цикла выделяли следующие фазы клеточного цикла: subG0G1 (< 2n), G0G1 (2n), G2/M (2n-4n) и S (> 4n). Пролиферативный потенциал 2×10^5 /лунку КМ-МНК до и после инкубации с эритропоэтином в спонтанном и стимулированном конканавалином А (Кон А, 10 мкг/мл; Sigma, США), фитогемагглютином А (ФГА, 10 мкг/мл; Sigma, США), липополисахаридом (ЛПС, 1 мкг/мл; Sigma, США), эритропоэтином (33,4 МЕ/мл) и перекисью водорода (1, 3 и 5 мМ/мл, H₂O₂; Sigma, США) тестах в питательной среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-buffer (Sigma, США)

и 80 мкг/мл гентамицина (Дальхимфарм, Россия) оценивали через 72 часа инкубации в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) по включению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (Sigma, США) на спектрофотометре Stat Fax 2100 (США). Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 for Windows (StatSoft, США). Меры центральной тенденции и рассеяния описаны средней (М) и стандартным отклонением (SD), достоверность различий оценивали с помощью ANOVA и принимали при значениях $p \leq 0,05$.

Результаты

Эритропоэтин влияет на уровень экспрессии CD184 на эндотелиальных прогениторных клетках

Ранее показано, что в общем пуле КМ-МНК больных ИБС присутствуют основные популяции стволовых/прогениторных клеток: гемопоэтические, эндотелиальные и мезенхимальные [13]. С учетом важной роли в процессах ангиогенеза эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в своей работе мы сосредоточили внимание на влиянии кратковременной экспозиции КМ-МНК с эритропоэтином на фенотип, клеточный цикл и апоптоз/некроз среди данной популяции клеток костного мозга больных ИБС (табл. 1).

ЭПК — это неоднородная популяция клеток костного мозга, несущая на своей мембране разнообразные молекулы, которые отражают динамику созревания и дифференцировки от менее зрелых форм к зрелым формам эндотелиоцитов. Одним из маркеров ЭПК является мембранный белок, обеспечивающий межклеточную адгезию стволовых клеток с внеклеточным матриксом костного мозга или со стромальными клетками, CD34. Так, количество CD34⁺/CD45⁻ клеток у больных ИБС не превышает 1% от общего пула КМ-МНК. В то же время количество CD34⁺/CD45⁺ клеток — свыше 5% (гемопоэтические стволовые клетки). Среди ЭПК принято выделять ранние и поздние, незрелые и зрелые клетки. О нахождении ЭПК на ранних/поздних стадиях дифференцировки судят по наличию экспрессии CD133 (проминин-1). У больных ИБС количество ранних ЭПК (CD34⁺/CD133⁺ = 11,23±16,2%) больше поздних ЭПК (CD34⁺/CD133⁻ = 0,78±1,15%). О зрелости ЭПК судят по экспрессии CD31 (молекула адгезии тромбоцитов/эндотелиоцитов 1) и VEGFR-2 (рецептор тирозинкиназы III типа). Количество зрелых форм ЭПК (CD34⁺/VEGFR-2⁺ и CD34⁺/CD31⁺) у больных ИБС находится в районе 1%. Кроме этого, в пуле CD34⁺ имеются клет-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ИНКУБАЦИИ КМ-МНК С ЭРИТРОПОЭТИНОМ НА ЭКСПРЕССИЮ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ (% , M±SD)

TABLE 1. EFFECT OF SHORT-TERM INCUBATION OF BM-MNCs WITH ERYTHROPOIETIN ON SURFACE MARKER EXPRESSION (% , M±SD)

Фенотип КМ-МНК Phenotype of BM-MNCs	Исходно Basal	После инкубации с эритропоэтином Erythropoietin-treated
Эндотелиальные прогениторные клетки Endothelial progenitor cells		
CD34 ⁺ /CD133 ⁺	0,87±0,58	0,33±0,27
CD34 ⁺ /CD31 ⁺	0,78±0,87	0,55±0,54
CD34 ⁺ /CD131 ⁺	2,67±2,93	1,69±1,73
CD34 ⁺ /CD184 ⁺	2,67±2,93	1,69±1,73*
CD31 ⁺ /CD184 ⁺	6,13±6,80	11,48±12,71*
CD34 ⁺ /KDR ⁺	1,09±0,96	1,51±2,49
CD34 ⁺ /EpoR ⁺	0,80±0,84	0,55±0,39
Мезенхимальные стволовые клетки Mesenchymal stem cells		
CD90 ⁺ /CD73 ⁺	2,35±5,46	3,47±0,02
CD90 ⁺ /CD105 ⁺	4,04±4,79	8,80±9,66
CD73 ⁺ /CD105 ⁺	1,28±2,04	1,20±0,72

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

Note. * p, significance of differences with basal parameters (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И АПОПТОЗ КМ-МНК (% , M±SD)

TABLE 2. EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON BM-MNCs DISTRIBUTION IN CELL CYCLE AND APOPTOSIS (% , M±SD)

Параметры Parameter	Исходно Basal	После инкубации с эритропоэтином Erythropoietin-treated
Клеточный цикл Cell cycle		
subG0G1	5,58±3,05	6,12±3,07*
G0G1	78,25±10,15	85,29±2,98*
S	3,25±1,25	1,08±0,74*
G2/M	14,85±6,30	7,10±2,31*
Апоптоз Apoptosis		
Annexin V ⁺ /PI ⁻	6,98±6,65	5,47±8,20
Annexin V ⁺ /PI ⁺	3,07±4,55	4,2±10,3
Annexin V ⁻ /PI ⁺	2,72±8,40	1,58±3,10

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ки, несущие рецептор к эритропоэтину. О количестве МСК в пуле КМ-МНК судили по наличию CD90 (мембранный гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов), CD73 (поверхностно-клеточный протеин с энзимной и проводящей сигнал активностью) и CD105 (эндоглин), показано, что их количество не превышает 5%. Что касается эффекта кратковременной экспозиции

КМ-МНК с эритропоэтином, то отмечено уменьшение количества CD34⁺ и увеличение количества CD31⁺, несущих «хоминг-рецептор» (фузин, CD184), по сравнению с исходным количеством (p ≤ 0,05).

Эритропоэтин задерживает КМ-МНК в фазе покоя клеточного цикла

О функциональной активности клеток костного мозга можно судить по клеточному циклу

и уровню апоптоза. Нами показано, что количество $CD34^+$ клеток больных ИБС в 78% случаев находятся в фазе покоя/начального роста (G0G1), а после экспозиции с эритропоэтином количество клеток в G0G1 возрастает, как следствие снижения доли клеток в фазе подготовки к митозу/митоз (G2/M) и фазе синтеза/репликации (S) (табл. 2; $p \leq 0,05$). В то же время эритропоэтин увеличивал долю апоптотических клеток (subG0G1) ($p \leq 0,05$). С другой стороны, нами не выявлено существенных различий по уровню апоптоза/некроза в пуле $CD34^+$ клеток больных ИБС до и после экспозиции с эритропоэтином ($p \geq 0,05$).

Эритропоэтин не влияет на экспрессию молекул адгезии на КМ-МНК

В реализации межклеточного взаимодействия, миграции и пролиферации важная роль отводится молекулам адгезии, поэтому нами исследован эффект кратковременной экспозиции КМ-МНК с эритропоэтином на количество поверхностных молекул адгезии (CD18 — интегрин бета-2, CD29 — бета-1-интегрин, CD44 — интегральный клеточный гликопротеин, CD49a — интегрин альфа-1, CD54 — молекула клеточной адгезии 1, CD62E — E-селектин, CD146 — молекула для альфа-ламинаина, CD202b — рецептор ангиопоэтин-1). Кратковременная экспозиция КМ-МНК больных ИБС существенно не влияла на количество $CD34^+$ клеток, несущих данные маркеры (табл. 3).

Преинкубация КМ-МНК с эритропоэтином снижает пролиферацию

Как видно из таблицы 4, не обработанные эритропоэтином КМ-МНК больных ИБС характеризуются устойчивостью к действию стимулирующих факторов, но снижают свой потенциал в условиях индукции окислительного стресса. Преинкубация КМ-МНК с эритропоэтином существенно снижает пролиферативный потенциал клеток как в спонтанном, так и в стимулированных тестах по сравнению с необработанными эритропоэтином КМ-МНК ($p \geq 0,05$), но при этом отмечена тенденция увеличения устойчивости КМ-МНК к окислительному стрессу.

Взаимосвязи фенотипа КМ-МНК

Показано, что количество $CD34^+/CD45^+$ клеток (гемопоэтические стволовые клетки) в костном мозге больных ИБС взаимосвязано с количеством $CD34^+/CD184^+$, $CD34^+/CD133^+$, $CD34^+/KDR^+$ и $CD34^+/CD31^+$ клеток ($r = 0,50$, $r = 0,47$, $r = 0,44$ и $r = 0,45$; $p \leq 0,05$ соответственно). Кроме этого, между количеством КМ-МНК с фенотипом $CD34^+/CD31^+$ и количеством КМ-МНК с фенотипом $CD34^+/EpoR^+$ и $CD31^+/CD184^+$ показана взаимозависимость ($r = 0,74$ и $r = 0,50$, $p \leq 0,05$ соответственно).

Необходимо отметить тот факт, что количество $CD34^+/CD45^+$, экспрессирующих или не экспрессирующих рецептор к эритропоэтину, взаимосвязано с количеством ЭПК, экспрессирующих или не экспрессирующих рецептор к эритропоэтину. В частности, количество $CD45^+/EpoR^+$ клеток взаимосвязано с количеством $CD34^+/EpoR^+$ клеток, а количество $CD45^+/EpoR^+$ клеток с количеством $CD34^+/EpoR^+$ клеток ($r = 0,66$ и $r = 0,59$; $p \leq 0,05$ соответственно). Установлена сопряженность между возрастом больных ИБС и количеством $CD34^+/CD133^+$, $CD34^+/CD31^+$ клеток ($r = 0,052$ и $r = 0,47$; $p \leq 0,05$ соответственно). Кроме этого, количество $CD45^+/EpoR^+$ и $CD34^+/EpoR^+$ клеток напрямую взаимосвязано с возрастом пациентов ($r = 0,43$ и $r = 0,49$; $p \leq 0,05$ соответственно).

Обсуждение

Известно, что рецепторы к эритропоэтину имеются не только на эритроидных клетках, но и на других клетках, в том числе и на эндотелиальных прогениторных клетках [1, 4]. Авторы показали, что до 40% клеток, мобилизованных на периферию из костного мозга введением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, несут на своей поверхности рецептор к эритропоэтину [12]. Эритропоэтин взаимодействует с рецептором к нему, который существует в виде двух субъединиц или же в комбинации с CD131 (β — общее звено), через которые и осуществляется цитопротекторное действие эритропоэтина на клетки. Так, показано, что эритропоэтин в дозе 5 МЕ/мл стимулирует пролиферацию, закрытие раневого дефекта монослоя, миграцию и формирование сосудоподобных структур, повышает устойчивость эндотелиальных прогениторных клеток к действию окислительного стресса. Показано, что эритропоэтин стимулирует пролиферацию, снижает апоптоз и улучшает приживление эндотелиальных прогениторных клеток [7].

В работе авторов показано, что костномозговые мезенхимальные стволовые клетки мышей C57BL/6 от 3-го пассажа несут на своей мембране CD29 [14]. Показано, что эритропоэтин индуцирует снижение уровней малонового альдегида и повышение экспрессии CD54 и CD31 в клетках, полученных из эндотелия вен пупочного канатика человека (HUVEC) [10]. Дарбэпоэтин альфа (эритропоэз-стимулирующий агент) у больных с хронической почечной недостаточностью повышает количество эндотелиальных прогениторных клеток, несущих на своей поверхности CD146 после 4 недель терапии [17]. У больных хронической почечной недостаточностью в сыворотке крови выявляются повышенные уровни растворимых молекул адгезии [9]. Терапия

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ИНКУБАЦИИ КМ-МНК С ЭРИТРОПОЭТИНОМ НА ЭКСПРЕССИЮ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ (% , M±SD)

TABLE 3. EFFECT OF SHORT-TERM INCUBATION BM-MNCs WITH ERYTHROPOIETIN ON SURFACE ADHESION MOLECULES EXPRESSION (% , M±SD)

Фенотип КМ-МНК Phenotype of BM-MNCs	Исходно Basal	После инкубации с эритропоэтином Erythropoietin-treated
CD34 ⁺ /CD18 ⁺	1,4±1,3	1,70±2,18
CD34 ⁺ /CD54 ⁺	1,78±1,44	2,00±1,68
CD34 ⁺ /CD29 ⁺	97,28±2,31	89,20±11,63
CD34 ⁺ /CD44 ⁺	91,25±11,99	86,97±19,52
CD34 ⁺ /CD49a ⁺	37,93±23,88	56,0±6,5
CD34 ⁺ /CD62E ⁺	44,60±27,38	42,40±32,73
CD34 ⁺ /CD146 ⁺	6,85±10,86	5,87±6,05
CD34 ⁺ /CD202b ⁺	13,65±11,77	13,65±7,58

ТАБЛИЦА 4. ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КМ-МНК (ОПТ. ПЛОТ.; M±SD)

TABLE 4. EFFECT OF ERYTHROPOIETIN OF BM-MNCs PROLIFERATION (OD, M±SD)

Параметр Parameter	Исходно Basal	После инкубации с эритропоэтином Erythropoietin-treated
Спонтанная Spontaneous	0,63±0,16	0,45±0,17*
Конканавалин А Concanavalin A	0,55±0,13	0,42±0,13*
Фитогемагглютинин А Phytohemagglutinin A	0,61±0,09	0,44±0,11*
Липополисахарид Lipopolysaccharides	0,69±0,09	0,49±0,15*
Эритропоэтин Erythropoietin	0,67±0,19	0,50±0,12
H ₂ O ₂ 1 мМ	0,65±0,19	0,34±0,09*
H ₂ O ₂ 3 мМ	0,55±0,14	0,35±0,14*
H ₂ O ₂ 5 мМ	0,46±0,19	0,37±0,16

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

больных с хронической почечной недостаточностью рекомбинантным эритропоэтином человека спустя 2 месяца приводила к увеличению в сыворотке крови таких больных растворимого Е-селектина и снижению уровней растворимого ICAM-1 и VCAM-1, тем самым влияя и на количество молекул адгезии на эндотелиальных прогениторных клетках. Нам не удалось найти в доступной нам литературе данных об эффектах кратковременной предобработки эритропоэтином костномозговых стволовых/прогениторных

клеток на количество поверхностных молекул адгезии.

Заключение

Таким образом, кратковременная экспозиция костномозговых мононуклеаров больных ишемической болезнью сердца влияет на количество ЭПК, несущих «хоминг-рецептор», задерживает CD34⁺ клетки в фазе покоя, уменьшает долю клеток в фазе синтеза и митоза и не влияет на количество клеток, несущих на своей мембране молекулы адгезии.

Список литературы / References

1. Захаров Ю.М. Цитопротекторные функции эритропоэтина // Клиническая нефрология. 2009. № 1. С. 16-21. [Zakharov Yu.M. Citoprotective effects of erythropoietin. *Klinicheskaya nefrologiya* = *Clinical Nephrology*, 2009, no. 1, pp. 16-21. (In Russ.)]

2. Лыков А.П., Бондаренко Н.А., Сахно Л.В., Шевела Е.Я., Повещенко О.В., Ким И.И., Никонорова Ю.В., Коненков В.И. Влияние секреторных факторов эндотелиальных клеток на пролиферативную и миграционную способность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека // *Фундаментальные исследования*, 2014. № 4, ч. 2. С. 36-42. [Lykov A.P., Bondarenko N.A., Sakhno L.V., Shevela E.Ya., Poveshchenko O.V., Kim I.I., Nikonorova Yu.V., Konenkov V.I. The impact of secretory factors endothelial cells on the functional activity of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2014, no. 4, Pt 2, pp. 36-42. (In Russ.)]
3. Лыков А.П., Никонорова Ю.В., Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., Ким И.И., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. Изучение пролиферации, миграции и продукции оксида азота костномозговыми мультипотентными мезенхимными стромальными клетками крыс Вистар при гипоксии и гипергликемии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2015. Т. 159, № 4. С. 432-434. [Lykov A.P., Nikonorova Yu.V., Bondarenko N.A., Poveshchenko O.V., Kim I.I., Poveshchenko A.F., Konenkov V.I. Proliferation, migration, and production of nitric oxide by bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells from Wistar rats in hypoxia and hyperglycemia. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, Vol. 159, no. 4, pp. 432-434. (In Russ.)]
4. Осиков М.В., Ахматов В.Ю., Телешева Л.Ф., Федосов А.А., Агеев Ю.И., Суровяткина Л.Г. Плейотропные эффекты эритропоэтина при хронической почечной недостаточности // *Фундаментальные исследования*, 2013. № 7, ч. 1. С. 218-224. [Osikov M.V., Akhmatov V.Yu., Telesheva L.F., Fedosov A.A., Ageev Yu.I., Surovyatkina L.G. Pleiotropic effects of erythropoietin in chronic renal failure. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2013, no. 7, Pt 1, pp. 218-224. (In Russ.)]
5. Bennis Y., Sarlon-Bartoli G., Guillet B., Lucas L., Pellegrini L., Velly L., Blot-Chabaud M., Dignat-Georges F., Sabatier F., Pisano P. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential. *J. Thromb. Haemost.* 2012, Vol. 10, no. 9, pp. 1914-1928.
6. Hristov M., Zerneck A., Bidzhekov K., Liehn E.A., Shagdarsuren E., Ludwig A., Weber C. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ. Res.*, 2007, Vol. 100, no. 4, pp. 590-597.
7. Hu R., Cheng Y., Jing H., Wu H. Erythropoietin promotes the protective properties of transplanted endothelial progenitor cells against acute lung injury via PI3K/Akt pathway. *Shock*, 2014, Vol. 42, no. 4, pp. 327-336.
8. Jang W.Y., Kim H.J., Li H., Jo K.D., Lee M.K., Yang H.O. The neuroprotective effect of erythropoietin on rotenone-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells through the induction of autophagy. *Mol. Neurobiol.*, 2016, Vol. 53, pp. 3812-3821.
9. Kahraman S., Yilmaz R., Kirkpantur A., Genctoy G., Arici M., Altun B., Erdem Y., Yasavul U., Turgan C. Impact of rHuEPO therapy initiation on soluble adhesion molecule levels in haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)*, 2005, Vol. 10, no. 3, pp. 264-269.
10. Kamianowska M., Szczepanski M., Skrzydlewska E. Effects of erythropoietin on ICAM-1 and PECAM-1 expressions on human umbilical vein endothelial cells subjected to oxidative stress. *Cell Biochem. Funct.*, 2011, Vol. 29, no. 6, pp. 437-441.
11. Kandala J., Upadhyay G.A., Pokushalov E., Wu S., Drachman D.E., Singh J.P. Meta-analysis of stem cell therapy in chronic ischemic cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.*, 2013, Vol. 112, no. 2, pp. 217-225.
12. Kang J., Yun J.Y., Hur J., Kang J.A., Choi J.I., Ko S.B., Lee J., Kim J.Y., Hwang I.C., Park Y.B., Kim H.S. Erythropoietin priming improves the vasculogenic potential of G-CSF mobilized human peripheral blood mononuclear cells. *Cardiovasc. Res.*, 2014, Vol. 104, no. 1, pp. 171-182.
13. Lykov A.P., Poveshchenko O.V., Cherniavsky A.M., Fomichev A.V., Surovtseva M.A., Bondarenko N.A., Kim I.I., Kareva Y.E., Tarkova A.R. Phenotype of bone marrow mononuclear cells before and after short-time precondition with Erythropoietin from patients with ischemic heart failure. *Russian Open Medical Journal*, 2018, Vol. 7, no. 2, pp. 202-208.
14. Liu N.M., Tian J., Wang W.W., Han G.F., Cheng J., Huang J., Zhang J.Y. Effects of erythropoietin on mesenchymal stem cells function of differentiation and secretion cultured under acute kidney injury microenvironment. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2012, Vol. 92, no. 6, pp. 417-421.
15. Madigan M., Atoui R. Therapeutic use of stem cells for myocardial infarction. *Bioengineering (Basel)*, 2018, Vol. 5, no. 2, E28. doi: 10.3390/bioengineering5020028.
16. Seurder D., Radrizzani M., Turchetto L., Lo Cicero V., Soncin S., Muzzarelli S., Auricchio A., Moccetti T. Combined delivery of bone marrow-derived mononuclear cells in chronic ischemic heart disease: rationale and study design. *Clin. Cardiol.*, 2013, Vol. 36, no. 8, pp. 435-441.
17. Mohler E.R. 3rd, Lifeng Zhang, Medenilla E., Rogers W., French B., Bantly A., Moore J.S., Yonghong Huan, Murashima M., Berns J.S. Effect of darbepoetin alfa on endothelial progenitor cells and vascular reactivity in chronic kidney disease. *Vasc. Med.*, 2011, Vol. 16, no. 3, pp. 183-189.
18. Tse H.F., Siu C.W., Zhu S.G., Songyan L., Zhang Q.Y., Lai W.H., Kwong Y.L., Nicholls J., Lau C.P. Paracrine effects of direct intramyocardial implantation of bone marrow derived cells to enhance neovascularization in chronic ischaemic myocardium. *Eur. J. Heart Failure*, 2007, Vol. 9, pp. 747-753.
19. Wang Q.R., Wang B.H., Zhu W.B., Huang Y.H., Li Y., Yan Q. An *in vitro* study of differentiation of hematopoietic cells to endothelial cells. *Bone Marrow Res.*, 2011, Vol. 2011, 846096. doi: 10.1155/2011/846096.

Авторы:

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

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

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

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

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

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

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

Authors:

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

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

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

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

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

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

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

Поступила 06.07.2019
Отправлена на доработку 13.09.2019
Принята к печати 16.09.2019

Received 06.07.2019
Revision received 13.09.2019
Accepted 16.09.2019

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИТЕЛ К ЭРИТРОПОЭТИНУ У ПАЦИЕНТОВ, ПРОХОДЯЩИХ ТЕРАПИЮ ПРЕПАРАТАМИ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭРИТРОПОЭТИНА

Кудряшова А.М.¹, Нестеренко Л.Н.¹, Генералова Г.А.²,
Абасеева Т.Ю.², Михайлова Н.А.¹, Борисова О.В.¹

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

² Центр гравитационной хирургии крови и гемодиализа «ГБУЗ «Детская городская клиническая больница святого Владимира Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Резюме. Целью исследования является характеристика антител к эритропоэтину в сыворотках крови пациентов, проходящих терапию препаратами эритропоэтина.

Проанализированы 106 сывороток крови пациентов, получавших препараты эритропоэтина. Для сравнительного анализа были исследованы 134 сыворотки пациентов, не получавших препараты ЭПО. Исследование проводили методом твердофазного ИФА при пассивной иммобилизации рчЭПО и иммунохимической через стептавидин-биотиновое взаимодействие. Выявление антител к эритропоэтину проводили с использованием мышиных моноклональных антител к IgG, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека, конъюгированных с пероксидазой хрена, а при количественном определении – конъюгата протеина-А с пероксидазой. В качестве калибровочного стандарта применяли поликлональные антитела кролика к ЭПО человека с известной концентрацией. Для построения калибровочного графика были выбраны шесть калибровочных образцов в диапазоне концентраций 16–1000 нг/мл. Предел обнаружения составил 12 нг/мл, а предел количественного обнаружения – 31 нг/мл.

При иммунохимической иммобилизации частота выявления суммарных IgG-антител увеличилась в 3,2 раза, IgG1 – в 1,1 раз, IgG2 – в 1,25 раза, IgG3 – в 1,5 раза, IgG4 – в 1,7 раза. У большинства пациентов были обнаружены антитела со смешанным изотипом, в 3-х образцах были детектированы только IgG1- или IgG4-антитела к ЭПО. В выборке из 106 образцов IgM-антитела не определялись, суммарные IgG-антитела были выявлены в 36,8% случаев, в 34% образцов их наличие было подтверждено выявлением антител хотя бы одного из подклассов. IgG1-антитела были выявлены в 83,3%, IgG4 – в 80,6% образцов, в которых присутствовали суммарные IgG-антитела. Во всех случаях антитела IgG2 и/или IgG3 подклассов были обнаружены в присутствии IgG1- или IgG4-антител. Концентрация антител составила 3,2–35,5 мкг/мл у 28 пациентов, у 8 пациентов уровень антител был более 50 мкг/мл, у 3-х находился ниже предела количественного обнаружения. Только в 6 образцах были выявлены антитела с индексом avidности более 50%.

Иммунохимическая иммобилизация антигена привела к повышению чувствительности при определении специфических антител всех подклассов. IgG-антитела были выявлены более чем в трети

Адрес для переписки:

Кудряшова Александра Михайловна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15.
Тел.: 8 (495) 674-54-97.
E-mail: 2238250@rambler.ru

Address for correspondence:

Kudryashova Alexandra M.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
115088, Russian Federation, Moscow,
1st Dubrovskaya str., 15.
Phone: 7 (495) 674-54-97.
E-mail: 2238250@rambler.ru

Образец цитирования:

А.М. Кудряшова, Л.Н. Нестеренко, Г.А. Генералова,
Т.Ю. Абасеева, Н.А. Михайлова, О.В. Борисова
«Характеристика антител к эритропоэтину
у пациентов, проходящих терапию препаратами
рекомбинантного человеческого эритропоэтина»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1.
С. 143–152. doi: 10.15789/1563-0625-COE-1879
© Кудряшова А.М. и соавт., 2020

For citation:

A.M. Kudryashova, L.N. Nesterenko, G.A. Generalova,
T.Yu. Abaseeva, N.A. Mikhailova, O.V. Borisova
“Characteristics of erythropoietin antibodies in patients treated
with recombinant human erythropoietin”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 1,
pp. 143–152.
doi: 10.15789/1563-0625-COE-1879
DOI: 10.15789/1563-0625-COE-1879

сывороток крови пациентов, получавших препараты ЭПО, преимущественно определялись низкоа-
видные антитела IgG1- и IgG4-подклассов.

Ключевые слова: эритропоэтин, твердофазный ИФА, антитела, иммуногенность, avidность, сыворотки крови человека

CHARACTERISTICS OF ERYTHROPOIETIN ANTIBODIES IN PATIENTS TREATED WITH RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN

Kudryashova A.M.^a, Nesterenko L.N.^a, Generalova G.A.^b,
Abaseeva T.Yu.^b, Mikhailova N.A.^a, Borisova O.V.^a

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

^b Center of Gravitational Surgery of Blood and Hemodialysis, Children's City Clinical Hospital of St. Vladimir, Moscow
Department of Health, Moscow, Russian Federation

Abstract. Our aim was to characterize anti-EPO antibodies in serum samples of the patients treated with erythropoietin. 106 serum samples from the patients treated with erythropoietin (EPO) were collected and assayed. 134 serum samples of patients who did not receive EPO were taken for comparative analysis. The anti-EPO antibody detection was performed in ELISA test with rhEPO, by passive capture on ELISA plates, using streptavidin-biotin immunochemical system. Mouse monoclonal antibodies to human IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 conjugated to horseradish peroxidase were used to detect anti-EPO antibodies, and protein-A peroxidase conjugate was used for quantitative assays. Rabbit anti-human EPO polyclonal antibodies at known concentrations were used as a calibration standard. Six calibration samples at the concentration range of 16-1000 ng/ml were used to plot calibration curves. The lower detection limit was 12 ng/mL, and the quantitative detection limit was 31 ng/ml. Immunochemical capturing led to increasing of total IgG antibody detection by 3.2 times, IgG1 — by 1.1 times IgG2 — by 1.25 times, IgG3 — by 1.5 times, IgG4 — by 1.7 times. Antibodies of mixed isotype were found in most patients. IgG1 or IgG4 antibodies to EPO were determined only in 3 samples. Specific IgM was not detectable among 106 sera samples, whereas total IgG antibodies were detected in 36.8 % of cases. In 34% of sera, their presence was confirmed by detection of at least one of the subclasses. IgG1 antibody was detected in 83.3%; IgG4, in 80.6% of the samples positive for total IgG antibodies. In all cases, IgG2 and/or IgG3 were detected in presence of IgG1 or IgG4 antibodies. The antibody concentration was 3.2 to 35.5 µg/mL in sera from 28 patients, in 8 cases the level of antibodies was > 50 µg/mL, however, being below the limit of quantitative detection in 3 patients. Only 6 samples contained antibodies with avidity index of > 50%. Immunochemical capturing of the antigen led to increased sensitivity for detecting all subclasses of specific antibodies. The specific IgG antibodies to EPO were found in more than 1/3 of serum samples from the patients treated with erythropoietin. Low-avidity antibodies of IgG1 and IgG4 subclasses were determined in most cases.

Keywords: erythropoietin, antibodies, ELISA, immunogenicity, avidity, human serum

Введение

Терапия препаратами эритропоэтина проводится при хронической почечной недостаточности, онкозаболеваниях, при трансплантации органов и эритропоэтиндефицитных анемиях. Серьезной проблемой такой терапии является выработка антител, приводящая к изменению фармакокинетического профиля и снижению эффективности лечения. При длительном приеме препаратов эритропоэтина может происходить выработка нейтрализующих антител, способных перекрестно реагировать с эндогенным

эритропоэтином, что приводит к редкому, но тяжелому осложнению — полной аплазии красного костного мозга (ПАКМ) [7, 14, 15, 16, 17].

Основными факторами, влияющими на возникновение специфических антител, являются подкожный путь введения препаратов, продолжительность лечения, различия в структуре нативного и рекомбинантного эритропоэтина, а также компоненты, входящие в состав лекарственных форм [4, 6, 20].

Выявление антител к терапевтическим препаратам белковой природы предполагает

многоуровневый подход, включающий метод выявления суммарных антител к препарату, характеристику выявленных антител в отношении их изотипов, концентрации и авидности [3, 10]. Определение IgM- и IgG-классов антител, а также индекса авидности может свидетельствовать о стадии процесса образования специфических антител. Также определение различных IgG-изотипов может служить дополнительным тестом, подтверждающим специфичность определения суммарных IgG-антител. Наличие антител к эритропоэтину разных IgG-подклассов описано как у пациентов без ПАККМ, так и при развитии этого заболевания. IgG4-антитела обычно генерируются при длительном приеме препаратов эритропоэтина. Установлено, что у всех пациентов с ПАККМ прежде всего выявляются IgG4- и IgG1-антитела к эритропоэтину [2, 3]. Возможно, что увеличение концентрации IgG4-антител может ассоциироваться с развитием ПАККМ [22].

Наиболее часто для определения антител используется твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) как метод, обладающий высокой чувствительностью, доступностью и высокой пропускной способностью [2, 9]. Задачей настоящего исследования являлась разработка методов определения антител к эритропоэтину методом твердофазного иммуноферментного анализа и их использование для характеристики специфических антител у группы пациентов, проходящих терапию препаратами рекомбинантного эритропоэтина.

Материалы и методы

В работе исследованы 106 сывороток крови пациентов, проходивших терапию препаратами эритропоэтина. Для сравнительного анализа исследованы 134 сыворотки пациентов, не получавших препараты ЭПО.

Эритропоэтин рекомбинантный человеческий (рчЭПО, Shandong Kexing Bioproducts). Реактивы: 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, компоненты буферных растворов (Sigma, Fluka, Helicon). Конъюгат белка А с пероксидазой хрена (ООО Имтек), антитела мышинные моноклональные к IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека (ОАО Биалекса), антитела к эритропоэтину кроличьи поликлональные (Sigma), антитела мышинные моноклональные к IgG и IgM человека, стрептавидин (ООО «Сорбент»). Растворы готовили на деионизированной воде (Milli-Q System, Millipore, США). Для ИФА метода использовали прозрачные 96-луночные планшеты для иммунологических исследований (Costar).

Инкубацию планшетов проводили на термостатируемом планшетном встряхивателе (ELMI

SkyLine) при режиме 700 об/мин и температуре 37 °С. После всех инкубаций проводили отмывку планшетов на планшетном промывателе (StatFax). Оптическую плотность измеряли на аппарате BioRad Model 680.

Получение препарата биотинилированного человеческого рекомбинантного эритропоэтина (Би-чрЭПО) проводили с использованием EZ-LinkSulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Scientific) при 20-кратном избытке биотина в соответствии с инструкцией производителя. Избыток непрореагировавшего биотинового реагента удаляли на AmiconUltra 0,5 ml 3K (Millipore). Получение конъюгатов мышинных моноклональных антител к IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека с пероксидазой хрена осуществляли по методу Накане [18].

При иммунохимической иммобилизации в 96-луночные планшеты вносили стрептавидин в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,6 в концентрации 2 мкг/мл. Планшеты выдерживали в течение 19-22 часов при температуре (4-8) °С, затем на 1 час вносили 0,02 М фосфатный буферный раствор pH 7,2, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Твин 20. В лунки планшета с иммобилизованным стрептавидином вносили по 100 мкл Би-рЭПО в концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали в течение 45 минут, затем отмывали 7 раз ФСБ-Т.

В методе с пассивной иммобилизацией чрЭПО на первой стадии вносили в лунки планшета по 100 мкл чрЭПО в концентрации 5 мкг/мл в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ), pH 9,6. Планшеты выдерживали в течение 19-22 часов при температуре (4-8) °С, затем на 1 час вносили 0,02 М фосфатный буферный раствор pH 7,2, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Твин 20.

Последующие стадии были аналогичны для обоих методов. Образцы сывороток вносили в разведении 1/50 и после инкубирования в течение 45 минут и отмывки вносили по 100 мкл конъюгатов с пероксидазой, соответственно, белка А или моноклональных антител мыши к IgG или IgM человека. Повторяли этап инкубирования и вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Для выявления подклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 после аналогичного внесения образцов добавляли по 100 мкл конъюгата моноклональных антител мыши с пероксидазой хрена к соответствующему подклассу и инкубировали в течение

30 минут. Далее анализ проводили, как описано выше.

Определение индекса avidности (ИА) проводили путем анализа каждого из образцов в двух лунках. После стадии инкубации с образцами сывороток в одну из лунок вносили 150 мкл денатурирующего раствора на основе 8 М мочевины, в другую — 150 мкл 0,02 М фосфатного буферного раствора pH 7,2, содержащего 0,05% Твин 20. Выдерживали 10 мин при комнатной температуре. Далее анализ проводили, как описано выше. Индекс avidности рассчитывали по формуле: $IA = (OP_{др}/OP_{фсб}) \times 100\%$, где $OP_{др}$ и $OP_{фсб}$ — оптические плотности в лунках, обработанных денатурирующим раствором и буфером соответственно.

Оптимизация условий проведения иммуноферментного анализа

В каждом случае проводили подбор параметров ИФА с целью достижения максимальной чувствительности и специфичности. Чувствительность для всех методов выявления антител характеризовали индексом позитивности (ИП), то есть отношением $OP_{образца}/OP_{порог}$, где $OP_{порог} = OP_{ср.К} + 3\sigma$, где $OP_{ср.К}$ — среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для выборки сывороток крови пациентов, никогда не получавших препараты эритропоэтина. Образец рассматривали как содержащий антитела при $OP_{образца}/OP_{порог} > 1$. Предел количественного обнаружения определяли по калибровочному графику как $OP_{порог} = OP_{ср.К} + 10\sigma$. Критерий Вилкоксона использовали для сравнения результатов, полученных для разных условий эксперимента. Величина $p \leq 0,05$ рассматривалась как статистически значимая. Полученные данные анализировали с помощью программного

обеспечения OriginPro 9.1 (64-bit) SR3 b87 (Origin Lab Corporation) и программного обеспечения Microsoft Office Excel 2013.

Результаты

Ранее было показано, что при выявлении антител к эритропоэтину в сыворотках крови экспериментальных животных после введения препаратов эритропоэтина более высокая чувствительность наблюдалась в методе с использованием иммунохимической иммобилизации по сравнению с пассивной. [1]. В связи с этим схемы иммуноферментного метода, использовавшиеся в данной работе, включали выявление антител к ЭПО (IgG, IgM, IgG1, IgG2 IgG3 и IgG4) через стрептавидин-биотиновое взаимодействие и при пассивной иммобилизации чрЭПО [6]. При иммунохимической иммобилизации на первой стадии проводили связывание биотинилированного чрЭПО с иммобилизованным на поверхности планшета стрептавидином. Далее вносили исследуемые образцы, затем соответствующие конъюгаты моноклональных антител с пероксидазой. При наличии в исследуемых образцах антител к ЭПО происходило образование иммунных комплексов, и после внесения субстратной буферной смеси результаты ферментативной реакции оценивали спектрофотометрически. На основании анализа 134 образцов сывороток доноров, не получавших препараты ЭПО, установлен порог отсека для определения индекса позитивности в каждом варианте ИФА.

В анализируемых образцах IgM-антитела не были выявлены, результаты по тестированию суммарных IgG-антител, а также антител подклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 в сыворотках крови пациентов, проходящих терапию пре-

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ЭПО В СЫВОРОТКАХ ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАВШИХ ПРЕПАРАТЫ ЭПО, В ИФА С РАЗНЫМИ СПОСОБАМИ ИММОБИЛИЗАЦИИ рчЭПО НА ПЛАНШЕТЕ

TABLE 1. COMPARISON OF ANTI-EPO ANTIBODIES DETECTION IN SERUM SAMPLES OF PATIENTS TREATED WITH ERYTHROPOIETIN IN ELISA EMPLOYING rhEPO CAPTURING ON THE ELISA PLATES BY DIFFERENT WAYS

Метод иммобилизации рчЭПО Method of immobilization rhEPO	Количество образцов, содержащих АТ к ЭПО Number of samples containing anti-EPO antibody				
	IgG суммарные IgG total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Пассивная Passive	12	27	8	20	17
Иммунохимическая Immunochemical	39	30	10	30	29
р-значение p-value	< 0,001	0,05	0,05	< 0,001	< 0,001

Примечание. Достигнутый уровень значимости p указывается для критерия Вилкоксона в каждой группе.

Note. The achieved significance level p is indicated for the Wilcoxon test in each group.

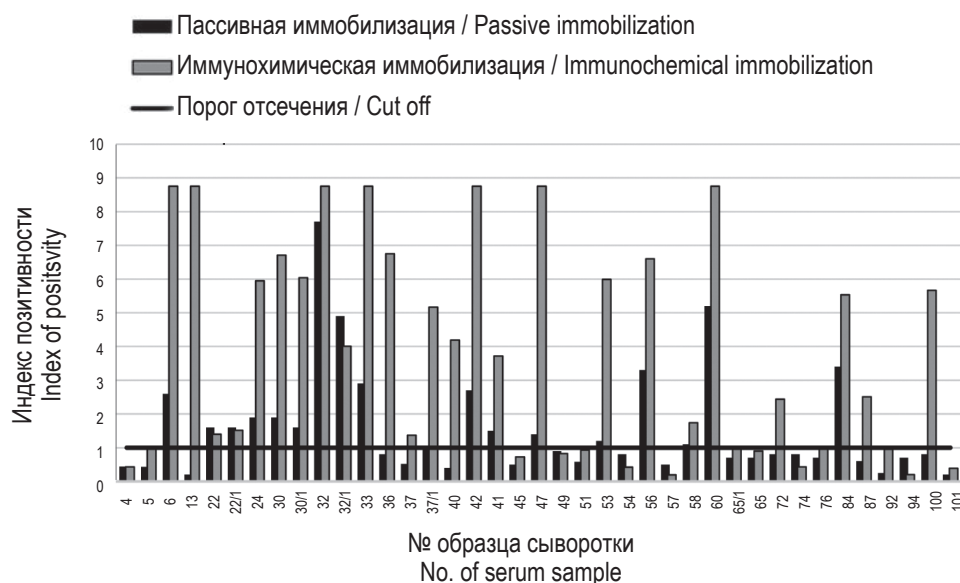


Рисунок 1. Результаты выявления IgG4-антител к эритропоэтину в ИФА с разными способами иммобилизации рчЭПО на планшете

Figure 1. Result obtained for anti-EPO IgG4 antibodies detection in ELISA employing rhEPO capturing on the ELISA plates by different ways

паратами эритропоэтина, свидетельствуют, что при иммунохимической иммобилизации чрЭПО достигнута более высокая чувствительность, однако этот эффект проявлялся в разной степени (табл. 1). В качестве примера приведены результаты определения IgG4-антител на рисунке 1. В целом суммарные IgG-антитела выявлены в 39 из 106 образцов, то есть в 36,8%, в 36 образцах наличие суммарных антител подтвердилось выявлением антител разных подклассов.

Для количественного определения суммарных IgG были использованы поликлональные антитела кролика к ЭПО и конъюгат белка А с пероксидазой. Содержание антител в исследуемых образцах определяли по калибровочному графику, построенному на основании концентрации калибровочных образцов и соответствующим им значениям ОП. Для построения калибровочного графика были выбраны шесть калибровочных образцов с концентрацией 16, 31, 62, 125, 250, 500, 1000 нг/мл. Измерение каждого калибровочного образца проводили в 4 повторях и коэффициент вариации каждого образца составил 1,4-6,6% и для нижнего калибратора 9,6%. Предел обнаружения составил 12 нг/мл, а предел количественного обнаружения 31 нг/мл. Пример калибровочного графика представлен на рисунке 2. Для оценки правильности аналитической методики использовали тест на линейность при разведении и метод добавок. В методе добавок анализировали как тестируемые сыворотки, так и их смеси с калибровочными образцами в равных объемах, далее определяли содержание антител

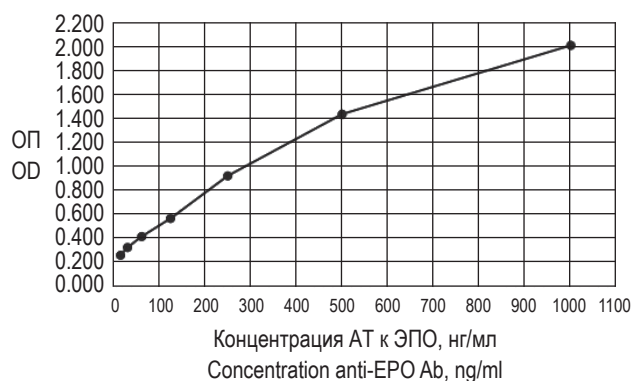


Рисунок 2. Пример калибровочного графика для определения анти-ЭПО антител

Примечание. В качестве стандарта использовались поликлональные антитела кролика к ЭПО человека.

Figure 2. Standard curve of an anti-EPO ELISA

Note. Rabbit polyclonal anti-EPO antibody was used as standards.

по калибровочному графику и сравнивали полученные значения с расчетными. Процент отклонения экспериментальных данных от расчетных составил не более 18% для двух методов. Оценку воспроизводимости проводили при определении содержания антител к ЭПО в исследуемых образцах сывороток в трех независимых экспериментах, при этом коэффициент вариации не превышал 12%.

У 28 пациентов антитела выявлены в концентрации от 3,2-35,5 мкг/мл, при этом у 8 пациентов уровень антител был более чем 50 мкг/мл и у 3 находился ниже предела количественного обнаружения.

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА СЫВОРОТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ, ПРОХОДЯЩИХ ТЕРАПИЮ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ ЭРИТРОПОЭТИНА

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF SERUM SAMPLES OF PATIENTS TREATED WITH ERYTHROPOIETIN

№	ИП* IP*	АТ к ЭПО, мкг/мл anti-EPO Ab, µg/ml	ИА** IA**	Содержание подклассов IgG Contents of IgG subclasses
4	2,3	< ПКО*** < LLOQ***	–	IgG1, IgG3
5	2,1	5,6	24	IgG1, IgG3, IgG4
6	2,2	> 50	51	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
13	1,9	6,7	52	IgG1, IgG3, IgG4
22	2,9	26,2	25	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
22/1	2,1	19,7	24	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
24	5,8	> 50	64	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
30	7,6	> 50	44	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
30/1	7,4	23,9	43	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
32	7,1	> 50	54	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
32/1	3,9	> 50	52	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
33	2,9	15,0	39	IgG4
36	3,5	> 50	30	IgG1, IgG3, IgG4
37	1,8	13,4	34	IgG3, IgG4
37/1	3,0	17,9	16	IgG1, IgG3, IgG4
40	2,6	6,4	30	IgG3, IgG4
41	7,5	11,1	42	IgG1, IgG3, IgG4
42	2,1	27,8	28	IgG1, IgG3, IgG4
45	2,3	3,2	–	–
47	3,0	24,0	29	IgG1, IgG4
49	4,2	13,3	31	IgG1, IgG3
51	1,5	< ПКО < LLOQ	–	–
53	2,9	12,7	30	IgG1, IgG3, IgG4
54	6,6	33,3	13	IgG1, IgG3
56	6,8	35,5	25	IgG1, IgG3, IgG4
57	3,3	9,1	41	IgG1
58	1,2	4,7	41	IgG1, IgG3, IgG4
60	5,2	> 50	18	IgG4
65	1,8	7,6	30	IgG3, IgG4
65/1	1,5	5,9	24	IgG2, IgG3, IgG4
72	3,1	8,5	32	IgG1, IgG3, IgG4
74	4,1	10,8	32	IgG1, IgG3
76	2,1	6,3	–	IgG1, IgG3
84	11,8	> 50	56	IgG1, IgG4
87	2,8	18,3	37	IgG1, IgG3, IgG4
92	1,9	8,0	23	IgG1, IgG3, IgG4
94	2,1	15,7	48	IgG1, IgG3
100	1,5	7,9	19	IgG1, IgG2, IgG4
101	1,3	< ПКО < LLOQ	–	–

Примечание. * – результаты получены в методе с иммунохимической иммобилизацией эритропоэтина. ** – индекс avidности рассчитывался при ОП ≥ 0,4. *** – предел количественного обнаружения.

Note. *, the results were obtained in the method with immunochemical immobilization of EPO. **, the avidity index was calculated at OD ≥ 0.4. ***, the lower limit of quantification.

Характеристика сывороток пациентов, у которых были выявлены суммарные IgG-антитела к эритропоэтину, включающая оценку их количественного содержания, индексы авидности и изотипы, представлена в таблице 2.

Обсуждение

Полученные результаты показали, что выбор метода иммобилизации чрЭПО влияет на чувствительность выявления антител к ЭПО в сыворотках крови пациентов, получавших терапевтические препараты ЭПО. Эффект метода иммобилизации проявлялся в разной степени, наиболее выраженный эффект наблюдался при выявлении суммарных IgG-, IgG3- и IgG4-антител к эритропоэтину (табл. 1). В целом индекс позитивности изменялся в широком диапазоне: от уменьшения (в единичных случаях) до увеличения в 43 раза.

Сравнение двух аналогичных подходов при проведении иммуноферментного анализа в формате, когда для захвата и детекции антител к эритропоэтину использовали антиген, было проведено в работах [9, 21]. Более высокая чувствительность была достигнута также при применении планшетов с иммобилизованным стрептавидином для связывания биотинилированного эритропоэтина, при этом разница в количестве выявленных антител отличалась для различных образцов сывороток крови пациентов, проходящих терапию препаратами рекомбинантного эритропоэтина и в отдельных случаях превышала два порядка.

Разница в чувствительности методов вероятно определяется конформацией иммобилизованного антигена и характером антител в анализируемом образце. Пассивная сорбция может приводить к изменению конформации чрЭПО и, соответственно, к недоступности ряда эпитопов для связывания со специфическими антителами к конформационным эпитопам. По литературным данным, в большинстве образцов сывороток крови пациентов с полной аплазией красного костного мозга обнаружены антитела к нативным эпитопам эритропоэтина и лишь в единичных случаях — к денатурированной форме ЭПО [5]. Можно предположить, что такой характер синтеза наблюдается не только для нейтрализующих антител, что делает использование метода с иммунохимической иммобилизацией антигена предпочтительным.

В настоящем исследовании суммарные IgG-антитела были выявлены в 36,8% образцов сывороток крови пациентов, получавших препараты ЭПО, что согласуется с литературными данными, где частота выявления была в пределах от 6 до 67% [3, 8, 19].

При количественном определении суммарных IgG-антител для приготовления калибровочных образцов использовали поликлональные антитела кролика к ЭПО с известной концентрацией. При оценке правильности и воспроизводимости такой методики в тестах на линейность при разведении, методе добавок и при определении коэффициента вариации были получены результаты, являющиеся приемлемыми в соответствии с рядом нормативных документов [11, 12, 13]. Однако следует отметить, что наблюдалась низкая корреляция между результатами выявления антител с использованием антивидового конъюгата и конъюгата белка А с пероксидазой.

По результатам работы, у 28 пациентов антитела были выявлены в концентрациях от 3,2 до 35,5 мкг/мл, при этом у 8 пациентов уровень антител был более чем 50 мкг/мл. При отсутствии доступных стандартных образцов, содержащих антитела человека, поликлональные антитела кролика к ЭПО использовали для количественного определения в ряде работ, где антитела к эритропоэтину были выявлены до концентрации 7 мкг/мл и 30 мкг/мл соответственно [9, 15]. При этом во всех исследованиях источником стандартных образцов служили поликлональные антитела кролика к ЭПО человека из разных источников, что затрудняет сравнение результатов.

Определение индекса авидности показало, что только у 6 пациентов были выявлены антитела с индексом авидности более 50%, которые можно рассматривать как высокоавидные, при этом у 5 из них выявленное содержание антител к ЭПО превышало 50 мкг/мл.

У большинства пациентов были обнаружены антитела различных изотипов, в 3-х образцах детектированы только IgG1- или IgG4-антитела к ЭПО. Превалирование антител IgG1-подкласса (в 83,3% образцов) коррелирует с описанными данными [3], IgG4-антитела были выявлены в 80,6% случаев. Все подклассы IgG-антител были обнаружены у 8 пациентов. У трех пациентов наличие суммарных IgG-антител не было подтверждено выявлением антител хотя бы одного из подклассов, что может свидетельствовать как о более высокой чувствительности метода выявления суммарных IgG-антител, так и о ложнопозитивном результате. Анализ данных по исследуемой выборке показывает, что во всех случаях антитела IgG2- и/или IgG3-подклассов выявлялись в присутствии IgG1- или IgG4-антител, что позволяет использовать выявление антител IgG1- или IgG4-подклассов для подтверждения специфичности выявления суммарных IgG-антител к ЭПО.

Список литературы / References

1. Кудряшова А.М., Борисова О.В., Михайлова Н.А., Лоншаков Д.В., Катлинский А.В. Влияние методов иммобилизации эритропоэтина на чувствительность выявления специфических IgG к ЕПВ в сыворотках крови экспериментальных животных // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии, 2017. №. 6. С. 49-55. [Kudryashova A.M., Borisova O.V., Mikhailova N.A., Lonshakov D.V., Katlinsky A.V. Effect of methods of immobilization of erythropoietin on the sensitivity for the detection of specific IgG to EPO in experimental animals sera. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, no. 6, pp. 49-55. (In Russ.)]
2. Barger T.E., Kuck A.J., Chirmule N., Swanson S.J., Mytych D.T. Detection of anti-ESA antibodies in human samples from PRCA and non-PRCA patients: an immunoassay platform comparison. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2012, Vol. 27, pp. 688-693.
3. Barger T.E., Wrona D., Goletz T.J., Mytych D.T. A detailed examination of the antibody prevalence and characteristics of anti-ESA antibodies. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2012, Vol. 27, no. 10, pp. 3892-3899.
4. Bennett C.L., Luminari S., Nissenson A.R., Tallman M.S., Klinge S.A., McWilliams N., McKoy J.M., Kim B., Lyons E.A., Trifilio S.M., Raisch D.W., Evens A.M., Kuzel T.M., Schumock G.T., Belknap S.M., Locatelli F., Rossert J., Casadevall N. Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. *N. Engl. J. Med.*, 2004, Vol. 351, no. 14, pp. 1403-1408.
5. Casadevall N. Antibodies against rHuEPO: native and recombinant. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2002, Vol. 17, no. 5, pp. 42-47.
6. Casadevall N., Eckardt K.U., Rossert J. Epoetin-induced autoimmune pure red cell aplasia. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005, Vol. 16, no.1, pp. 67-69.
7. Casadevall N., Nataf J., Viron B., Kolta A., Kiladjian J.J., Martin-Dupont P., Michaud P., Papo T., Ugo V., Teyssandier I., Varet B., Mayeux P. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N. Engl. J. Med.*, 2002, Vol. 346, no. 7, pp. 469-475.
8. El-Din M., Attia F., Labib S., Omar W. Detection of circulating antierythropoietin antibodies in patients with end stage renal disease on regular hemodialysis. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2010, Vol. 32, no. 3, pp. 336-343.
9. Gross J., Moller R., Henke W. Detection of anti-EPO antibodies in human sera by a bridging ELISA is much more sensitive when coating biotinylated rhEPO to streptavidin rather than using direct coating of rhEPO. *J. Immunol. Methods*, 2006, Vol. 313, no. 1-2, pp. 176-182.
10. Guideline on immunogenicity assessment of therapeutic proteins. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2017. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-immunogenicity-assessment-therapeutic-proteins-revision-1_en.pdf.
11. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP), 2009. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-validation-bioanalytical-methods_en.pdf.
12. Guideline Validation of analytical procedures (Q2 R1), ICH harmonised tripartite guideline, 2005. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf.
13. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2013. Available at: <http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/UCM368107.PDF>.
14. Herrington W., Wieser C., Rosenkranz A.R. Pure red cell aplasia after treatment of renal anaemia with epoetin theta. *Clin. Kidney J.*, 2013, Vol. 6, no. 5, pp. 539-542.
15. Hoesel W., Gross J., Moller R., Kanne B., Wessner A., Müller G., Müller A., Gromnica-Ihle E., Fromme M., Bischoff S., Haselbeck A. Development and evaluation of a new ELISA for the detection and quantification of antierythropoietin antibodies in human sera. *J. Immunol. Methods*, 2004, Vol. 294, no. 1-2, pp. 101-110.
16. Macdougall I.C., Casadevall N., Locatelli F., Combe C., London G.M., di Paolo S., Kribben A., Fliser D., Messner H., McNeil J., Stevens P., Santoro A., de Francisco A.L., Percheson P., Potamianou A., Foucher A., Fife D., Mérit V., Vercammen E. Incidence of erythropoietin antibody-mediated pure red cell aplasia: the Prospective Immunogenicity Surveillance Registry (PRIMS). *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2015, Vol. 30, no. 3, pp. 451-460.
17. Macdougall I.C., Roger S.D., de Francisco A., Goldsmith D.J., Schellekens H., Ebberts H., Jelkmann W., London G., Casadevall N., Hörl W.H., Kemeny D.M., Pollock C. Antibody-mediated pure red cell aplasia in chronic kidney disease patients receiving erythropoiesis stimulating agents: new insights. *Kidney Int.*, 2012, Vol. 81, no. 8, pp. 727-732.
18. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *Histochem. Cytochem.*, 1974, Vol. 22, no. 2, pp. 1084-1091.

19. Öztürk S., Gümüş A., Memili V., Düz M.E., Cebeci E., Koldaş M., Kazancioğlu R. Antierythropoietin Antibodies in hemodialysis patients treated with recombinant erythropoietin. *Turk. Neph. Dial. Transpl.*, 2014, Vol. 23, no. 2, pp. 125-130.
20. Seidl A., Hainzl O., Richter M., Fischer R., Böhm S., Deutel B., Hartinger M., Windisch J., Casadevall N., London G.M., Macdougall I. Tungsten-induced denaturation and aggregation of epoetin alfa during primary packaging as a cause of immunogenicity. *Pharm. Res.*, 2012, Vol. 29, no. 6, pp. 1454-1467.
21. Shin S.K., Ha S.K., Lee K.W., Yoo T.H., Yun S.R., Yoon S.H., Kim S.J., Lee S.K., Heo T.H. Application of a bridging ELISA for detection of anti-erythropoietin binding antibodies and a cell-based bioassay for neutralizing antibodies in human sera. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, Vol. 52, no. 2, pp. 289-293.
22. Weeraratne D.K., Kuck A.J., Chirmule N., Mytych D.T. Measurement of anti-erythropoiesis-stimulating agent IgG4 antibody as an indicator of antibody-mediated pure red cell aplasia. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2013, Vol. 20, no. 1, pp. 46-51.

Авторы:

Кудряшова А.М. — научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Нестеренко Л.Н. — к.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Генералова Г.А. — педиатр-нефролог, Центр гравитационной хирургии крови и гемодиализа «ГБУЗ «Детская городская клиническая больница святого Владимира Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Authors:

Kudryashova A.M., Research Associate, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Nesterenko L.N., PhD (Chemistry), Leading Research Associate, Viral Genome Cloning Laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Generalova G.A., Pediatrician-Nephrologist, Centre of Gravitational Surgery of Blood and Hemodialysis, Children's City Clinical Hospital of St. Vladimir, Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

Абасеева Т.Ю. — педиатр-нефролог, Центр гравитационной хирургии крови и гемодиализа «ГБУЗ «Детская городская клиническая больница святого Владимира Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Михайлова Н.А. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Борисова О.В. — к.х.н., заведующая лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Abaseeva T.Yu., Pediatrician-Nephrologist, Center of Gravitational Surgery of Blood and Hemodialysis, Children's City Clinical Hospital of St. Vladimir, Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

Mikhailova N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Protective Antigens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Borisova O.V., PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 23.10.2019
Отправлена на доработку 20.11.2019
Принята к печати 03.12.2019

Received 23.10.2019
Revision received 20.11.2019
Accepted 03.12.2019

ЛИМФОИДНАЯ ТКАНЬ СТЕНКИ ТОНКОЙ И ТОЛСТОЙ КИШОК У АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ (*NEOVISON VISON*)

Панфилов А.Б., Пестова И.В.

ФГБОУ ВО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия», г. Киров, Россия

Резюме. При разведении норок возникает достаточно много проблем, связанных с нарушением функции воспроизводства, рождением слабого потомства, нарушением обмена веществ, ослаблением иммунитета. Причиной является слабая изученность морфологии норок и недостаток обстоятельных сведений об их иммунной системе. Наибольшее количество антигенов поступает в организм через стенку желудочно-кишечного тракта вместе с кормом и водой, вызывая изменения в ассоциированной со слизистыми оболочками лимфоидной ткани — первом барьере на пути их проникновения. Цель — изучить синтопию, морфологию и количественные характеристики кишечного лимфоидной ткани у американской норки (*Neovison vison*). Биоматериалом для исследований служили органокомплексы тонкой и толстой кишок от 11 американских норок в возрасте 8 месяцев, который получали из зверохозяйства «Вятка» поселка Зониха Слободского района Кировской области. В стенке тонкой и толстой кишок обнаруживаются как одиночные лимфоидные узелки, так и сгруппированные. Одиночные лимфоидные узелки выявляются в собственной пластинке слизистой оболочки и в подслизистой основе по всей длине кишок, за исключением подвздошной кишки. Лимфоидные узелки округлой или овальной формы распределены диффузно, плотность их на 1 см² составляет в двенадцатиперстной кишке — $0,62 \pm 0,08$, в тощей кишке — $1,88 \pm 0,32$, в ободочной кишке — $9,21 \pm 0,28$, в прямой кишке — $24,2 \pm 0,42$. На границе пилорической части желудка и двенадцатиперстной кишки одиночные лимфоидные узелки формируют кишечно-пилорическое лимфоидное кольцо, у места перехода прямой кишки в сфинктер анального отверстия — прямокишечное лимфоидное кольцо. Наличие обилия лимфоидных узелков в прямой кишке связано с половым содержанием животных и длительностью нахождения каловых масс в данном отделе кишечника. Лимфоидные бляшки встречаются в количестве двух в двенадцатиперстной кишке, 6–13 в тощей кишке, в стенке подвздошной кишки встречается одна крупная полосовидная (языковидная) лимфоидная бляшка, 1–3 бляшки обнаруживаются в стенке ободочной кишки. Наличие лимфоидных бляшек у американской норки в стенке ободочной кишки является защитно-приспособительным явлением, в связи с тем, что слепая кишка у семейства куньих отсутствует. Выявленные закономерности синтопии лимфоидной ткани у американской норки связаны с антигенностью кормовых масс и длительностью нахождения их в подвздошной, ободочной и прямой кишках.

Ключевые слова: лимфоидная ткань, бляшка, тонкая кишка, толстая кишка, американская норка

LYMPHOID TISSUE PATTERN IN THE WALLS OF SMALL AND LARGE INTESTINES IN AMERICAN MINK (*NEOVISON VISON*)

Panfilov A.B., Pestova I.V.

Vyatka State Agricultural Academy, Kirov, Russian Federation

Abstract. When breeding minks, a lot of problems are associated with disturbances of reproduction, birth of weak offspring, metabolic disorders, weakening of immunity. Poor knowledge of the morphology of mink and lack of detailed information about their immune system is among appropriate reasons. The largest variety of

Адрес для переписки:

Пестова Ирина Викторовна
ФГБОУ ВО «Вятская государственная
сельскохозяйственная академия»
610001, Россия, г. Киров, ул. Гороховская, 83, кв. 2.
Тел.: 8 (912) 723-15-85.
E-mail: irinapestova@yandex.ru

Address for correspondence:

Pestova Irina V.
Vyatka State Agricultural Academy
610001, Russian Federation, Kirov,
Gorokhovskaya str., 83, apt 2.
Phone: 7 (912) 723-15-85.
E-mail: irinapestova@yandex.ru

Образец цитирования:

А.Б. Панфилов, И.В. Пестова «Лимфоидная ткань
стенки тонкой и толстой кишок у американской норки
(*Neovison vison*)» // Медицинская иммунология, 2020.
Т. 22, № 1. С. 153–156.
doi: 10.15789/1563-0625-LTP-1811
© Панфилов А.Б., Пестова И.В., 2020

For citation:

A.B. Panfilov, I.V. Pestova “Lymphoid tissue pattern in the
walls of small and large intestines in American mink (*Neovison
vison*)”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 153–156.
doi: 10.15789/1563-0625-LTP-1811
DOI: 10.15789/1563-0625-LTP-1811

antigens enter the body with food and water, through the wall of gastrointestinal tract. The first barrier to their penetration is lymphoid tissue associated with mucous membranes, thus causing changes in immune structures. Our purpose was to study the syntopia, morphology and quantitative characteristics of intestine-associated lymphoid tissue in American mink (*Neovison vison*). A biomaterial for the study was organocomplex of the small and large intestines from 11 American Minks at the age of 8 months, obtained from the fur farm "Vyatka" (Zonikha, Slobodsky district, Kirov region). In the walls of small and large intestines, both single and grouped lymphoid nodules are found. Single lymphoid nodules are detected in lamina propria of the mucous membrane and in the submucosa, along the entire length of the intestines, except of the ileum. Lymphoid nodules are round or oval, distributed diffusely, their density per 1 cm² is in duodenum — 0.62 ± 0.08 ; in jejunum — 1.88 ± 0.32 ; in colon — 9.21 ± 0.28 ; in rectum — 24.2 ± 0.42 . At the border of pyloric part between the stomach and duodenum, single lymphoid nodules form an intestinal-pyloric lymphoid ring; at the site of transition from rectum to the anal sphincter, the rectal lymphoid ring is observed. Abundance of lymphoid nodules in rectal area is associated with semi-voluntary management of animals, and retention of fecal mass in this part of intestine. By two lymphoid plaques are found in the duodenum; 6 to 13, in the jejunum; one large striped (lingual) lymphoid plaque is found in the ileal wall; 1 to 3 plaques are found in the colonic wall. Presence of lymphoid plaques in colonic wall of American mink should be considered a protective/adaptive phenomenon, due to absence of coecum in the animals from *Mustelid* family. The revealed patterns of lymphoid tissue syntopia in American mink are associated with antigenicity of food substances and terms of their presence in the ileum, colon and rectum.

Keywords: lymphoid tissue, plaque, small intestine, large intestine, American mink

Введение

С 2013 года отрасли звероводства в России стали уделять повышенное внимание на федеральном уровне и рассматривать ее как неотъемлемую часть самобытной культуры нашей страны. Основными объектами звероводства в России являются норки, лисицы, соболи, песцы и нутрии. Самым популярным и распространенным пушным зверем является норка — на ее долю приходится около 85% шкурок, которые производят в стране. Интерес к выращиванию норок связан с высоким спросом потребителей на меховые изделия из их шкурок [1].

Однако в норководстве возникло много проблем, связанных с нарушением функции воспроизводства, рождением слабого потомства, нарушением обмена веществ, ослаблением иммунитета. Причиной является слабая изученность морфологии норок и недостаток обстоятельных сведений об их иммунной системе.

Наибольшее количество антигенов поступает в организм через стенку желудочно-кишечного тракта вместе с кормом и водой, вызывая изменения в ассоциированной со слизистыми оболочками лимфоидной ткани — первом барьере на пути их проникновения.

Лимфоидная ткань стенки кишечника представлена диффузной лимфоидной тканью, одиночными лимфоидными узелками (солитарными), сгруппированными лимфоидными узелками (пейеровыми бляшками) и лимфогляндулярными комплексами.

В доступной анализируемой литературе данных о лимфоидной ткани и ее морфометрических параметрах у американской норки (*Neovison vison*) нами не обнаружено.

Цель — изучить синтопию, морфологию и количественные характеристики кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани у американской норки (*Neovison vison*).

Материалы и методы

Биоматериалом для исследований служили органокомплексы тонкой и толстой кишок американской норки в естественной синтопии, которые брали от клинически здоровых животных, подобранных методом аналогов, хорошей упитанности и правильного телосложения.

Всего нами исследован биоматериал от 11 норок в возрасте 8 месяцев у самцов и самок, который получали из ЗАО Зверохозяйство «Вятка» п. Зониха Слободского района Кировской области.

Подготовку кадаверного материала и дифференцировку лимфоидных узелков проводили по Т. Hellman [3].

Названия анатомических структур и образований приведены в соответствии с Международной ветеринарной анатомической номенклатурой [2].

Полученные цифровые данные статистически обработаны.

Результаты

Площадь двенадцатиперстной кишки у американской норки составляет $17,5 \pm 6,7$ см² (табл. 1). В стенке кишки обнаруживаются как одиночные лимфоидные узелки, так и сгруппированные. Одиночные лимфоидные узелки выявляются в собственной пластинке слизистой оболочки по всей длине кишки, овальной формы, распределены диффузно. Плотность их на 1 см² составляет $0,62 \pm 0,08$. Площадь узелков — $0,005$ см². В проксимальном отделе обнаруживаются два наиболее крупных лимфоидных образования размером $0,04 \pm 0,01$ см², отдаленных друг от друга на 0,5 см. Бляшки округлой, овальной формы располагаются антимерцентриально. Количество узелков в бляшке составляет $5,0 \pm 0,06$.

На границе пилорической части желудка и двенадцатиперстной кишки одиночные лим-

фоидные узелки формируют кишечно-пилорическое лимфоидное кольцо. Площадь его составила $1,31 \pm 0,37 \text{ см}^2$. Плотность узелков в кольце варьирует от $265,75 \pm 58,8$ до $456,0 \pm 220,5$ на 1 см^2 . Площадь узелков в кольце находится в интервале $0,0001-0,0025 \text{ см}^2$.

Площадь тощей кишки у американской норки составляет $294,5 \pm 13,4 \text{ см}^2$ (табл. 1). В стенке кишки обнаруживаются одиночные лимфоидные узелки и лимфоидные бляшки. Солитарные лимфоидные узелки залегают как в собственной пластинке слизистой оболочки, так и в подслизистой основе. Плотность их на 1 см^2 стенки кишки — $1,88 \pm 0,32$.

Число лимфоидных бляшек у норок 6-13. Сгруппированные образования округлой или овальной формы в виде пластин (рис. 1) и треугольников. Бляшки в основном лежат антимезентериально или несколько сдвинуты влево или вправо (по ходу кишки). Часто лимфоидные бляшки расположены напротив друг друга. По площади они одинаковы или одна больше другой. В результате этого 2-4 бляшки по синтопии лежат ближе к брыжеечному краю. Первая лимфоидная бляшка находится на расстоянии $15,1 \pm 2,9 \text{ см}$ от дистального отдела двенадцатиперстной кишки. В проксимальном отделе бляшки расположены на расстоянии $7,65 \pm 2,25$ — $117,0 \pm 5,81 \text{ см}$, в дистальном отделе $5,41 \pm 2,41$ — $17,8 \pm 6,06 \text{ см}$. У норок между последними лимфоидными бляшками одиночные узелки собираются вместе по 3 или тянутся в виде цепочки. Число узелков в цепочке варьирует от 19 до 27. Размер солитарных узелков $0,0001 \text{ см}^2$. Площадь лимфоидных образований, число лимфоидных узелков в них показано в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. ПЛОЩАДЬ ТОНКОЙ И ТОЛСТОЙ КИШОК У АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПАРАМЕТРЫ ЛИМФОИДНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ В НИХ, $M \pm m$ (n = 11)

TABLE 1. AREA OF THE SMALL AND LARGE INTESTINE IN THE AMERICAN MINK AND THE QUANTITATIVE PARAMETERS OF LYMPHOID FORMATIONS IN THEM, $M \pm m$ (n = 11)

Наименование кишки Name of the intestine	Площадь, см^2 Area, cm^2	Количество лимфоидных узелков на 1 см^2 Number of lymphoid nodules per 1 cm^2	Площадь бляшек, см^2 Plaques area, cm^2	Количество лимфоидных узелков в бляшках Number of lymphoid nodules in plaques
Двенадцатиперстная Duodenum	$17,5 \pm 6,7$	$0,62 \pm 0,08$	$0,04 \pm 0,01$ (2)*	$5,00 \pm 0,06$
Тощая Jejunum	$294,5 \pm 13,4$	$1,88 \pm 0,32$	$0,57 \pm 0,04$ (6-13)*	$118,83 \pm 15,45$
Подвздошная Ileum	$16,50 \pm 3,52$	—	$2,84 \pm 0,34$ (1)*	$512,1 \pm 158,5$
Ободочная Colon	$20,20 \pm 2,02$	$9,21 \pm 0,28$	$0,51 \pm 0,03$ (1-3)*	$97,43 \pm 6,94$
Прямая Rectum	$32,40 \pm 5,12$	$24,20 \pm 0,42$	—	—

Примечание. * — количество встречающихся бляшек.

Note. *, number of plaques.

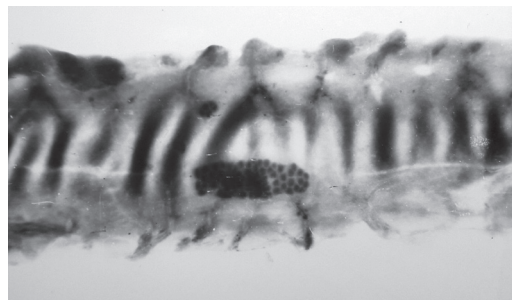


Рисунок 1. Лимфоидные бляшки в стенке тощей кишки у восьмимесячной американской норки

Примечание. Макропрепарат. Окраска по Т. Хеллман.

Figure 1. Lymphoid plaques in the jejunum wall of an eight-month-old American mink

Note. Macro specimens. Coloring by T. Hellman.

Площадь подвздошной кишки у американской норки составляет $16,5 \pm 3,52 \text{ см}^2$ (табл. 1). В стенке кишки встречается крупная полосовидная (языковидная) лимфоидная бляшка. Она располагается в подслизистой основе кишки, по форме бляшка напоминает язык, так как дистальный ее конец по сравнению с проксимальным расширен на $0,2-0,3 \text{ см}$ (рис. 2). Отдельные полосовидные лимфоидные бляшки встречаются в виде изогнутой полосы и как бы переходят справа налево, но залегают антимезентериально. Попадаются бляшки пирамидальной формы и байдарочного весла. У норок площадь бляшки $2,84 \pm 0,34 \text{ см}^2$, а число лимфоидных узелков на 1 см^2 находится в интервале от $479,3 \pm 10,0$ до $697,92 \pm 28,42$.

Площадь ободочной кишки у американской норки составляет $20,2 \pm 2,02 \text{ см}^2$ (табл. 1). У но-

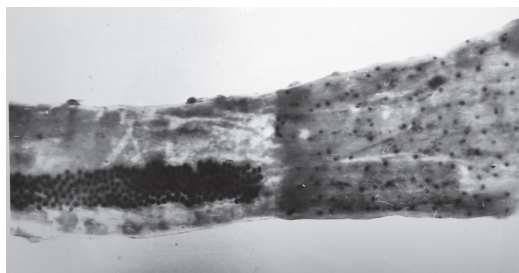


Рисунок 2. Полосовидная лимфоидная бляшка в стенке подвздошной кишки и одиночные лимфоидные узелки в стенке ободочной кишки у восьмимесячной американской норки

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. A striated lymphoid plaque in the ileum wall and single lymphoid nodules in the colon wall in an eight-month-old American mink

Note. As for Figure 2.

рок в стенке кишки встречаются как одиночные лимфоидные узелки, так и сгруппированные. Солитарные лимфоидные узелки распределены диффузно (рис. 2), размер их варьирует от 0,0004 до 0,01 см², количество их возрастает на 1 см² кишки и составляет 9,21±0,28. У норки встречаются в подслизистой основе 1-3 бляшки округлой формы. Площадь бляшек и количество лимфоидных узелков в них отражены в таблице 1. Наличие лимфоидных бляшек у американской норки в стенке ободочной кишки является защитно-приспособительным явлением, в связи с тем, что слепая кишка у семейства кунных отсутствует.

Площадь прямой кишки у американской норки составляет 32,4±5,12 см² (табл. 1). В стенке кишки находятся одиночные, овальные лимфоидные узелки. Плотность их на 1 см² стенки кишки у черной американской норки 24,2±0,42. Лимфоидные узелки распределены диффузно. Площадь одиночных лимфоидных узелков находится в интервале 0,0004-0,06 см². Одиночные лимфоидные узелки дистально формируют прямокишечное лимфоидное кольцо у места перехода прямой кишки в сфинктер анального отверстия. Площадь прямокишечного лимфоидного кольца 5,29±1,76 см². У норки плотность узелков на 1 см² кольца колеблется от 10,44±0,68 до 17,72±2,24. Наличие обилия лимфоидных узелков в прямой кишке связано с полувольным содержанием животных и длительностью нахождения каловых масс в данном отделе кишечника.

Заключение

Развитие лимфоидной ткани напрямую связано с условиями питания и содержания животных. Анализируя вышеизложенное, можно отметить, что плотность лимфоидной ткани постепенно нарастает к дистальному отделу тонкой кишки. В стенке подвздошной кишки обнаружена полосовидная (языковидная) лимфоидная бляшка. В ободочной и прямой кишках плотность одиночных лимфоидных узелков сильно возрастает. Такие закономерности синтопии лимфоидной ткани связаны с антигенностью кормовых масс и длительностью нахождения их в подвздошной, ободочной и прямой кишках.

Список литературы / References

1. Дрок Т.Е. Тенденции и перспективы развития пушного звероводства в эксклавном регионе России // Региональная экономика и управление: электронный научный журнал, 2017. № 4 (52). Номер статьи: 5216. Режим доступа: <https://eee-region.ru/article/5216/> [Drok T.E. Trends and prospects for the development of fur farming in the exclave region of Russia. *Regionalnaya ekonomika i upravlenie: elektronnyy nauchnyy zhurnal* = *Regional Economics and Management: Electronic Scientific Journal*, 2017, no. 4 (52), Article number: 5216. (In Russ.)] Access mode: <https://eee-region.ru/article/5216/>.
2. Зеленовский Н.В. Международная ветеринарная анатомическая номенклатура на латинском и русском языках. *Nomina Anatomica Veterinaria: учебное пособие*. СПб.: Лань, 2013. 400 с. [Zelenevsky N.V. International veterinary anatomical nomenclature in Latin and Russian. *Nomina Anatomica Veterinaria: textbook*. St. Petersburg: LAN, 2013. 400 p.
3. Hellman T. Studien uber das lymphoide Gewebe. Konstitutionsforschung, 1921. Lehre 8. pp. 191-219.

Авторы:

Панфилов А.Б. — д.вет.н., профессор, заведующий кафедрой диагностики, терапии, морфологии и фармакологии ФГБОУ ВО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия», г. Киров, Россия

Пестова И.В. — к.б.н., доцент кафедры диагностики, терапии, морфологии и фармакологии ФГБОУ ВО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия», г. Киров, Россия

Authors:

Panfilov A.B., PhD, MD (Veterinary), Professor, Head, Department of Diagnostics, Therapy, Morphology and Pharmacology, Vyatka State Agricultural Academy, Kirov, Russian Federation

Pestova I.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Diagnostics, Therapy, Morphology and Pharmacology, Vyatka State Agricultural Academy, Kirov, Russian Federation

Поступила 10.07.2019
Принята к печати 27.09.2019

Received 10.07.2019
Accepted 27.09.2019

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

Макарова О.В.¹, Постовалова Е.А.¹, Гао Ю.², Добрынина М.Т.²

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Резюме. На модели острого и хронического язвенного колита, индуцированного 1% раствором декстрансульфата натрия (ДСН) у мышей линии C57Bl/6, изучали половые различия субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови. Субпопуляционный состав лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии. Показано, что по сравнению с самцами у половозрелых самок мышей C57Bl/6 контрольной группы статистически значимо выше показатели относительного числа регуляторных Т- и цитотоксических Т-лимфоцитов. При остром язвенном колите у самок повышается относительное число хелперов, но снижается — цитотоксических Т-лимфоцитов, что отражает активацию иммунного ответа. У самцов снижается абсолютное число лейкоцитов, лимфоцитов и цитотоксических Т- и регуляторных Т-лимфоцитов, что связано с усилением миграции этих субпопуляций в очаг воспаления и регионарные лимфатические узлы. При хроническом язвенном колите по сравнению с контрольной группой и с острым язвенным колитом у самок снижается абсолютное количество лейкоцитов, лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов. По сравнению с острым язвенным колитом у самок увеличивается содержание регуляторных Т-лимфоцитов. У самцов при хроническом язвенном колите по сравнению с контролем снижается абсолютное число Т-хелперов и В-лимфоцитов, но повышается число регуляторных Т-лимфоцитов; по сравнению с острым язвенным колитом выше относительное содержание и абсолютное количество регуляторных Т-лимфоцитов. Повышение содержания Т-регуляторных лимфоцитов связано с усилением их дифференцировки в тимусе и усилением их миграции в очаг воспаления — ободочную кишку. Полученные в эксперименте результаты по половым различиям субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови являются базовыми при проведении подобных исследований у человека и показывают, что лечение язвенного колита разными лекарственными средствами, включая иммуномодуляторы, следует проводить с учетом пола.

Ключевые слова: половые различия, острый язвенный колит, хронический язвенный колит, мыши C57Bl/6, субпопуляционный состав лимфоцитов

Адрес для переписки:

Постовалова Екатерина Андреевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
морфологии человека»
117418, Россия, Москва, ул. Цюрипы, 3.
Тел.: 8 (965) 222-52-71.
E-mail: e.a.postovalova@gmail.com

Address for correspondence:

Postovalova Ekaterina A.
Research Institute of Human Morphology
117418, Russian Federation, Moscow, Tsyurupa str., 3.
Phone: 7 (965) 222-52-71.
E-mail: e.a.postovalova@gmail.com

Образец цитирования:

О.В. Макарова, Е.А. Постовалова, Ю. Гао, М.Т. Добрынина «Половые различия субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при экспериментальном остром и хроническом язвенном колите» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 157–164. doi: 10.15789/1563-0625-SDO-1661

For citation:

O.V. Makarova, E.A. Postovalova, Yu. Gao, M.T. Dobrynina "Sex differences of subpopulation composition of lymphocytes in the peripheral blood in experimental acute and chronic ulcerative colitis", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 157–164. doi: 10.15789/1563-0625-SDO-1661

SEX DIFFERENCES OF SUBPOPULATION COMPOSITION OF LYMPHOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD IN EXPERIMENTAL ACUTE AND CHRONIC ULCERATIVE COLITIS

Makarova O.V.^a, Postovalova E.A.^a, Gao Yu.^b, Dobrynina M.T.^b

^a Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

^b M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. We studied sex differences lymphocytes subpopulations of peripheral blood in adult C57Bl/6 mice during acute and chronic colitis, induced with 1% DSS. We measured subpopulations of lymphocytes with flow cytometry. We showed that in the control group the female mice had statistically significantly higher values of the relative number of regulatory and cytotoxic T lymphocytes comparing to the males. During acute colitis the females showed an increase in the relative number of T helpers and a decrease of cytotoxic T lymphocytes, which reflects the activation of immune response. The males had a decrease in the absolute number of leukocytes, lymphocytes and cytotoxic and regulatory T lymphocytes, probably because of an increase in migration of these cells to the inflammation locus and local lymph nodes. In chronic colitis the females had a decrease in the absolute number of leukocytes, lymphocytes, T helpers, cytotoxic T lymphocytes and B lymphocytes when comparing with acute colitis. During chronic colitis the males had a decrease in the absolute number of T helpers and B lymphocytes but an increase of regulatory T cells in comparison with the control group; in comparison with acute colitis the males with chronic colitis had higher relative and absolute number of regulatory T cells. The increase of T regulatory lymphocytes is due to an increase in their proliferation rate in the thymus and increase of their migration to the inflammatory locus – the colon. Future clinical studies may be based on these results, which show that the treatment of colitis, especially with immunotropic agents, must take sex differences into account.

Keywords: sex differences, acute colitis, chronic colitis, c57Bl/6 mice, lymphocytes subpopulations

Введение

Проблема половых различий иммунологических механизмов инфекционно-воспалительных заболеваний, а также особенностей тяжести их клинического течения является актуальной, так как лечение больных с учетом пола позволит повысить эффективность терапии [6]. По данным литературы, у мужчин по сравнению с женщинами выше показатели частоты встречаемости большинства воспалительных инфекционных заболеваний, а также смертности [6]. Половые гистофизиологические различия иммунной системы, играющей ключевую роль в развитии воспалительных заболеваний, определяются кариотипом и уровнем стероидных половых гормонов – эстрогенов, прогестерона, андрогенов и экспрессией клеточных рецепторов к ним [2, 3, 18]. Половые различия, обусловленные кариотипом, связаны с экспрессией генов на половых хромосомах. Эти гены кодируют специфические белки, которые участвуют в запуске и регуляции механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа. Половой диморфизм частоты развития и тяжести течения инфекционно-воспалительных и аутоиммунных заболеваний у человека особенно ярко проявляется после полового со-

зревания, что, очевидно, обусловлено влиянием половых гормонов на морфофункциональное состояние иммунной системы [2, 3, 18]. Показано, что у женщин репродуктивного возраста выраженность реакций клеточно-опосредованного и гуморального иммунного ответа выше, чем у мужчин [2, 4, 10]. По сравнению с мужчинами у женщин выше содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови и уровень продукции противовоспалительных цитокинов [3, 12, 15].

Половые различия воспалительных заболеваний кишечника представлены в литературе, главным образом, клиническими и статистическими данными. I.K. Kim и соавт. показали, что распространенность язвенного колита составляет 0,16 случаев на 100 000 человек [8]. Половых различий частоты развития язвенного колита не выявлено [7]. К сожалению, в большинстве клинических исследований, посвященных инфекционно-воспалительным заболеваниям, и в частности язвенному колиту, пол и репродуктивный статус не учитываются [8], в то время как они в значительной мере модифицируют как иммунный ответ, так и течение воспалительного процесса.

По данным литературы, нарушения функционирования иммунной системы при язвенном колите характеризуются изменением

баланса продукции про- и противовоспалительных цитокинов, факторов роста, а также соотношения Т-эффекторных и Т-регуляторных лимфоцитов [17]. Показано, что регуляторные Т-лимфоциты проявляют супрессорную активность *in vitro*, ингибируя пролиферацию Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов [22]. По данным М. Walecki и соавт., в периферической крови количество $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Т-регуляторных лимфоцитов у здоровых женщин значительно выше, чем у мужчин. Однако введение мышам супрафизиологической дозы тестостерона приводит к увеличению количества Т-регуляторных лимфоцитов и их функциональной активности [20].

Данные по оценке субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при язвенном колите у человека противоречивы и основаны на недостаточно репрезентативных группах пациентов по полу, возрасту и используемым для лечения лекарственным препаратам, а экспериментальные исследования половых различий иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови у мышей при ДСН-индуцированном язвенном колите не проводились.

Цель работы — изучение половых различий субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при остром и хроническом язвенном колите, индуцированном декстрансульфатом натрия у половозрелых мышей линии C57Bl/6.

Материалы и методы

Работа выполнена на половозрелых мышах линии C57Bl/6, самках ($n = 30$) и самцах ($n = 30$), полученных из питомника «Столбовая». Методом случайного отбора были сформированы контрольные и опытные группы, по 10 животных в каждой. Возраст животных составлял 6–8 недель, масса тела — 18–22 г. При работе с экспериментальными животными руководствовались Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 18 марта 1986 г.). На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека». Животные имели свободный доступ к питьевой воде и брикетированному корму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб»).

Острый язвенный колит у половозрелых самок ($n = 10$) и самцов ($n = 10$) моделировали по I. Okayasu и соавт. (1990), заменяли питьевую воду на 5 суток на 1% водный раствор декстрансульфата натрия (ДСН, Мг ~40,000, BioChemica, Германия), затем животные опытных групп 2 дня потребляли питьевую воду и были выведены из эксперимента на 7-е сутки.

С целью моделирования хронического язвенного колита мыши опытной группы обоего пола (половозрелые самки, $n = 10$ и самцы, $n = 10$) получали 1% водный раствор декстрансульфата натрия — ДСН в течение первых четырех суток эксперимента и повторно 3 дня с 12-х по 14-е и 5 дней с 22-х по 26-е сутки. Животных с хроническим язвенным колитом выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира на 60-е сутки.

Контрольные группы мышей обоего пола ($n = 10$) получали питьевую воду.

Проводили забор крови из шейных вен, в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА (5 мг/мл). Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США), использовали антитела CD3e-FITC, CD4-PE-Cy5, CD8a-PE-Cy7, CD19-PE (eBioscience, США). Выявление субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов проводили согласно протоколу с помощью наборов Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #3 (eBioscience, США).

Статистическую обработку показателей проводили с учетом характера распределения непараметрическими методами (U-критерий Манна–Уитни) в программе Statistica 8.0. Вычисляли медиану и интерквартильный размах — Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови позволил установить, что в контрольных группах у половозрелых самок мышей C57Bl/6, по сравнению с самцами, статистически значимо выше показатели относительного числа $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ регуляторных Т- и $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов (рис. 1, табл. 1).

При остром язвенном колите у самок по сравнению с контрольной группой повышалось относительное число $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов, но уменьшалось — $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов (табл. 2). При остром язвенном колите у самцов снижалось абсолютное число лейкоцитов, лимфоцитов и $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов, абсолютное число и относительное содержание $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов (рис. 1, табл. 3).

При хроническом язвенном колите по сравнению с контрольной группой у самок снижается абсолютное количество лейкоцитов, лимфоцитов, $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов, $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов, $CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов, но увеличивается содержание $CD4^+CD25^+FoxP3^+$

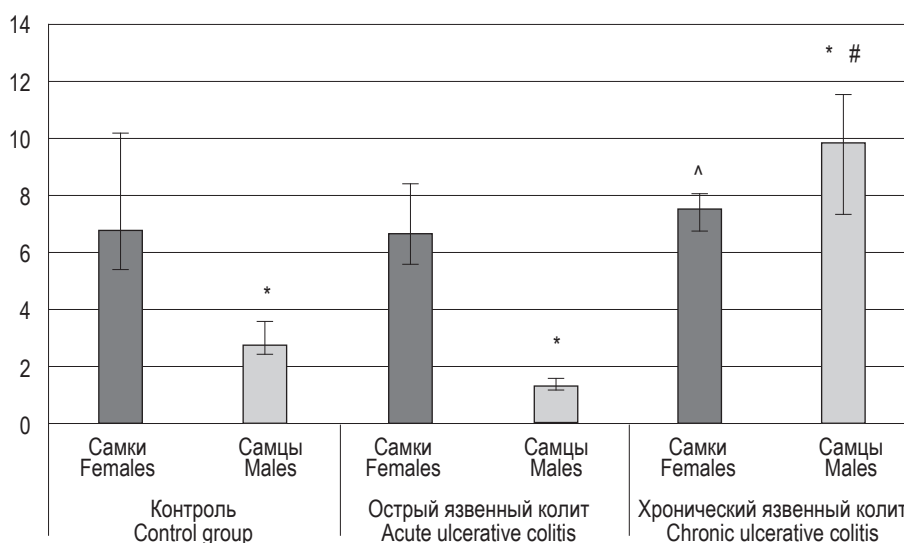


Рисунок 1. Относительное содержание регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови самок и самцов мышей линии C57Bl/6

Примечание. * – по сравнению с контрольной группой самцов; # – по сравнению с самцами с острым колитом; ^ – по сравнению с самками с острым колитом.

Figure 1. The relative content of regulatory T-lymphocytes in the peripheral blood of female and male C57Bl/6 mice

Note. *, in comparison with the control group of males; #, compared to males with acute colitis; ^, compared to females with acute colitis.

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У САМОК И САМЦОВ МЫШЕЙ C57Bl/6 КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. SUBPOPULATION OF LYMPHOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF FEMALE AND MALE C57Bl/6 MICE IN THE CONTROL GROUP, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Index		Самки Females	Самцы Males	Достоверность различий P-value
Лейкоциты, млн/мл (WBC) Leukocytes, million/ml (WBC)		7,80 (6,70-8,80)	9,38 (8,80-9,60)	0,08
Лимфоциты, млн/мл (LY) Lymphocytes, million/ml (LY)		5,30 (4,70-7,80)	7,50 (7,06-8,10)	0,26
Т-хелперы T-helpers (CD4 ⁺ CD3 ⁺)	% от лф % of lf	16,76 (14,80-17,70)	14,84 (14,14-16,00)	0,24
	млн/мл million/ml	0,99 (0,75-1,21)	1,18 (1,13-1,23)	0,21
Цитотоксические Т-лимфоциты Cytotoxic T lymphocytes (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	% от лф % of lf	16,00 (13,80-17,65)	12,88 (11,20-14,60)	0,02
	млн/мл million/ml	1,04 (0,71-1,17)	1,00 (0,91-1,17)	0,72
В-лимфоциты B lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁺)	% от лф % of lf	58,10 (53,70-60,35)	65,80 (57,90-66,80)	0,80
	млн/мл million/ml	3,40 (2,52-4,77)	4,49 (3,04-5,35)	0,24
Регуляторные Т-лимфоциты Regulatory T lymphocytes (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺)	% от Тх % of Th	6,80 (5,40-10,20)	2,80 (2,40-3,60)	0,02
	тыс/мл thousand/ml	41,88 (40,50-48,62)	33,56 (25,66-46,81)	0,21

Примечание. лф – лимфоциты; Тх – Т-хелперы.

Note. lf, lymphocytes; Th, T-helpers

ТАБЛИЦА 2. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У САМОК МЫШЕЙ C57Bl/6, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. SUBPOPULATION OF LYMPHOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF FEMALE C57Bl/6 MICE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Index		Периферическая кровь у самок Peripheral blood in females			Достоверность различий P-value		
		Контрольная группа Control group 1	Острый колит Acute colitis 2	Хронический язвенный колит Chronic ulcerative colitis 3	1-2	1-3	2-3
Лейкоциты, млн/мл (WBC) Leukocytes, million/ml (WBC)		7,80 (6,70-8,80)	7,60 (7,20-8,10)	5,40 (5,20-5,40)	0,96	0,006	0,003
Лимфоциты, млн/мл (LY) Lymphocytes, million/ml (LY)		5,30 (4,70-7,80)	5,70 (5,40-6,08)	3,50 (3,30-3,50)	0,84	0,03	0,003
Т-хелперы T-helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	% от лф % of lf	16,76 (14,80-17,70)	19,80 (19,60-20,40)	17,00 (16,40-18,10)	0,03	0,62	0,06
	млн/мл million/ml	0,99 (0,75-1,21)	1,17 (1,16-1,19)	0,57 (0,56-0,68)	0,62	0,003	0,008
Цитотоксические Т-лимфоциты Cytotoxic T lymphocytes (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	% от лф % of lf	16,00 (13,80-17,65)	12,40 (12,00-13,30)	16,90 (14,80-17,90)	0,05	0,72	0,03
	млн/мл million/ml	1,04 (0,71-1,17)	0,75 (0,67-0,77)	0,56 (0,55-0,62)	0,28	0,03	0,03
В-лимфоциты B lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁺)	% от лф % of lf	58,10 (53,70-60,35)	59,30 (57,10-60,50)	42,95 (39,60-50,85)	0,44	0,03	0,02
	млн/мл million/ml	3,40 (2,52-4,77)	3,44 (3,34-3,47)	1,50 (1,34-1,51)	0,98	0,01	0,008
Регуляторные Т-лимфоциты Regulatory T lymphocytes (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺)	% от Тх % of Th	6,80 (5,40-10,20)	6,70 (5,60-8,40)	7,60 (6,75-8,00)	0,45	0,02	0,38
	тыс/мл thousand/ml	41,88 (40,50-48,62)	90,70 (78,51-92,61)	43,05 (42,00-43,76)	0,94	0,76	0,008

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

регуляторных Т-лимфоцитов (рис. 1, табл. 2); по сравнению с острым язвенным колитом у самок уменьшается количество лейкоцитов, лимфоцитов, абсолютное число CD3⁺CD4⁺Т-хелперов, CD3⁺CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, относительное и абсолютное количество CD3⁺CD19⁺В-лимфоцитов, а также содержание CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регуляторных Т-лимфоцитов (рис. 1, табл. 2). У самцов при хроническом язвенном колите по сравнению с контролем снижается абсолютное число CD3⁺CD4⁺Т-хелперов и CD3⁺CD19⁺В-лимфоцитов, но повышается — CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регуляторных Т-лимфоцитов (рис. 1, табл. 3); по сравнению с острым язвенным колитом выше относительное содержание и абсолютное количество CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регуляторных Т-лимфоцитов в 7 и 5 раз соответственно (рис. 1, табл. 3).

Обсуждение

Работа посвящена половым различиям субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при экспериментальном остром и хроническом язвенном колите у половозрелых самок и самцов мышей линии C57Bl/6.

Выявленное нами у самок контрольной группы по сравнению с самцами более высокое относительное содержание в периферической крови регуляторных Т- и цитотоксических Т-лимфоцитов согласуется с данными литературы и соответствует результатам, полученным при исследовании мужчин и женщин репродуктивного возраста [20]. Показано, что тестостерон регулирует дифференцировку лимфоцитов путем супрессии IL-12-индуцированного фосфорилирования транскрипционного фактора STAT4, которому принадлежит ключевая роль в передаче

ТАБЛИЦА 3. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У САМЦОВ МЫШЕЙ C57Bl/6, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. SUBPOPULATION OF LYMPHOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF MALE C57Bl/6 MICE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Index		Периферическая кровь у самцов Peripheral blood in males			Достоверность различий P-value		
		Контрольная группа Control group 1	Острый колит Acute colitis 2	Хронический язвенный колит Chronic ulcerative colitis 3	1-2	1-3	2-3
Лейкоциты, млн/мл (WBC) Leukocytes, million/ml (WBC)		9,38 (8,80-9,60)	8,10 (6,90-8,30)	6,75 (4,40-11,70)	0,04	0,08	0,93
Лимфоциты, млн/мл (LY) Lymphocytes, million/ml (LY)		7,50 (7,06-8,10)	6,40 (6,30-6,60)	7,80 (6,50-9,40)	0,04	0,35	0,18
Т-хелперы T-helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	% от лф % of lf	14,84 (14,14-16,00)	15,40 (12,70-17,10)	11,75 (6,90-14,20)	0,95	0,02	0,25
	млн/мл million/ml	1,18 (1,13-1,23)	1,09 (0,80-1,13)	0,91 (0,56-1,19)	0,11	0,02	1,00
Цитотоксические Т-лимфоциты Cytotoxic T lymphocytes (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	% от лф % of lf	12,88 (11,20-14,60)	12,50 (9,80-14,15)	10,95 (9,30-19,40)	0,85	0,35	0,91
	млн/мл million/ml	1,00 (0,91-1,17)	0,83 (0,22-0,91)	0,97 (0,66-1,09)	0,04	0,29	0,25
В-лимфоциты B lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁺)	% от лф % of lf	65,80 (57,90-66,80)	62,60 (57,20-62,90)	44,20 (30,00-54,00)	0,09	0,001	0,09
	млн/мл million/ml	4,49 (3,04-5,35)	4,0 (3,77-4,08)	3,27 (2,56-4,47)	0,18	0,04	0,66
Регуляторные Т-лимфоциты Regulatory T lymphocytes (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺)	% от Тх % of Th	2,80 (2,40-3,60)	1,40 (1,20-1,60)	9,95 (7,30-11,50)	0,0005	0,0001	0,04
	тыс/мл thousand/ml	33,56 (25,66-46,81)	15,24 (4,42-15,26)	74,93 (51,10-121,67)	0,0005	0,0002	0,04

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

сигнала, приводящего к дифференцировке Th1-клеток [9].

При остром язвенном колите в периферической крови у самок по сравнению с контрольной группой повышается показатель содержания Т-хелперов, но снижается цитотоксических Т-лимфоцитов, а у самцов в 2 раза — регуляторных Т-лимфоцитов. Повышение содержания Т-хелперов у самок отражает активацию иммунного ответа, а изменение содержания цитотоксических Т-лимфоцитов соотносится с меньшей выраженностью воспалительного процесса. Снижение содержания в периферической крови у самцов с острым язвенным колитом регуляторных Т-лимфоцитов связано с усилением их миграции в очаг воспаления и регионарные лимфатические узлы [1, 16].

При хроническом язвенном колите в периферической крови у самок снижаются показатели

абсолютного числа лейкоцитов и лимфоцитов, содержания В-лимфоцитов, но увеличиваются — регуляторных Т-лимфоцитов. У самцов при хроническом язвенном колите по сравнению с контролем показатели и относительного, и абсолютного количества Т-хелперов и В-лимфоцитов снижаются, а регуляторных Т-лимфоцитов — возрастают.

Содержание регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови у самок возрастает в 1,2, а у самцов — 3,5 раза. Содержание В-лимфоцитов у самцов снижается. Повышение содержания Т-регуляторных лимфоцитов связано с усилением их дифференцировки в тимусе и усилением их миграции в очаг воспаления — ободочную кишку. Регуляторные Т-лимфоциты супрессируют пролиферацию эффекторных клеток путем секреции IL-10 и TGF- β [13]. Полагают, что недостаточное количество Т-регуляторных лимфоцитов в пери-

ферической крови приводит к обострению аутоиммунных и воспалительных заболеваний [5, 19]. J. Maul и соавт. и Y. Wang и соавт. показали, что у больных ВЗК наблюдается снижение содержания $CD4^+CD25^+$ клеток в периферической крови, а в слизистой оболочке толстой кишки при обострении заболевания количество Т-регуляторных клеток выше, чем в стадию ремиссии [14, 21]. Авторы объясняют снижение содержания Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови их миграцией в очаг воспаления — толстую кишку. I. Kryczek и соавт. установили, что повышение в собственной пластинке слизистой оболочки при язвенном колите $FoxP3^+IL-17^+CD4^+$ регуляторных Т-лимфоцитов, с одной стороны, индуцирует увеличение продукции провоспалительных цитокинов, а с другой — супрессирует функцию эффекторных Т-лимфоцитов [11]. Таким образом, Т-регуляторные лимфоциты играют двоякую функциональную роль в механизмах воспалительных реакций, поэтому необходимо проведение дальнейших исследований.

Полученные в эксперименте результаты по половым различиям субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови являются базовыми при проведении подобных исследований у человека и показывают, что лечение язвенного колита разными лекарственными средства-

ми, включая иммуностропные препараты, следует проводить с учетом пола.

Выводы

1. По сравнению с самцами у половозрелых самок мышей C57Bl/6 статистически значимо выше показатели относительного числа регуляторных Т- и цитотоксических Т-лимфоцитов.

2. При остром язвенном колите у самок повышается относительное число хелперов, но снижается — цитотоксических Т-лимфоцитов. У самцов снижается абсолютное число лейкоцитов, лимфоцитов и цитотоксических Т- и регуляторных Т-лимфоцитов.

3. При хроническом язвенном колите по сравнению с контрольной группой и с острым язвенным колитом у самок снижается абсолютное количество лейкоцитов, лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов. По сравнению с острым язвенным колитом увеличивается содержание регуляторных Т-лимфоцитов. У самцов при хроническом язвенном колите по сравнению с контролем снижается абсолютное число Т-хелперов и В-лимфоцитов, но повышается регуляторных Т-лимфоцитов; по сравнению с острым язвенным колитом выше относительное содержание и абсолютное количество регуляторных Т-лимфоцитов.

Список литературы / References

1. Кравченко П.Н., Олейник Е.К. Система регуляторных Т-клеток и аутоиммунные процессы // Труды Карельского научного центра РАН, 2013. № 3. С. 18-30. [Kravchenko P.N., Oleinik E.K. The system of regulatory T cells and autoimmunity. *Trudy Karelskogo nauchnogo tsentra RAN = Transactions of Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences*, 2013, no. 3, pp. 18-30. (In Russ.)]
2. Angele M.K., Frantz M.C., Chaudry I.H. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. *Clinics*, 2006, Vol. 61, no. 5, pp. 479-488.
3. Bouman A., Heineman M.J., Faas M.M. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum. Reprod. Update*, 2005, Vol. 11, no. 4, pp. 411-423.
4. Fish E.N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 9, pp. 737-744.
5. Frisullo G., Nociti V., Iorio R., Patanella A.K., Caggiula M., Marti A., Sancricca C., Angelucci F., Mirabella M., Tonali P.A., Batocchi A.P. Regulatory T cells fail to suppress $CD4^+T-bet^+$ T cells in relapsing multiple sclerosis patients. *Immunology*, 2009, no. 127, pp. 418-428.
6. Giefing-Kröll C., Berger P., Lepperdinger G., Grubeck-Loebenstien B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*, 2015, Vol. 14, no. 3, pp. 309-321.
7. Glickman R.M. Inflammatory bowel disease: ulcerative colitis and Crohn's disease. In: Wilson J.D., Braunwald E., Isselbacher K.J. Harrison's principles of internal medicine. New York, NY: McGraw-Hill, Inc., 1991, pp. 1268-1281.
8. Kim I.K., Park K.J., Kang G.H., Im J.P., Kim S.G., Jung H.C., Song I.S., Kim J.S. Risk factors for complications after total colectomy in ulcerative colitis. *Turk J. Gastroenterol.*, 2012, Vol. 23, no. 5, pp. 515-522.
9. Kissick H.T., Sanda M.G., Dunn L.K., Pellegrini K.L., On S.T., Noel J.K., Arredouani M.S. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, no. 27, pp. 9887-9892.
10. Knöferl M.W., Angele M.K., Schwacha M.G., Bland K., Chaudry I.H. Preservation of splenic immune functions by female sex hormones after trauma-hemorrhage. *Crit. Care. Med.*, 2002, Vol. 30, pp. 888-893.
11. Kryczek I., Wu K., Zhao E., Wei S., Vatan L., Szeliga W., Huang E., Greenson J., Chang A., Roliński J., Radwan P., Fang J., Wang G., Zou W. IL-17⁺ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *J. Immunol.*, 2011, no. 186, pp. 4388-4395.

12. Latham K.A., Zamora A., Drought H., Subramanian S., Matejuk A., Offner H., Rosloniec E.F. Estradiol treatment redirects the isotype of the autoantibody response and prevents the development of autoimmune arthritis. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, pp. 5820-5827.
13. Levings M.K., Bacchetta R., Schulz U., Roncarolo M.G. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2002, no. 129, pp. 263-276.
14. Maul J., Loddenkemper C., Mundt P., Berg E., Giese T., Stallmach A., Zeitz M., Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺CD25^(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2005, no. 128, pp. 1868-1878.
15. Mullen A.C., High F.A., Hutchins A.S., Lee H.W., Villarino A.V., Livingston D.M., Kung A.L., Cereb N., Yao T.P., Yang S.Y., Reiner S.L. Role of T-bet in commitment of Th1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*, 2001, Vol. 292, pp. 1907-1910.
16. Pedros C., Duguet F., Saoudi A., Chabod M. Disrupted regulatory T cell homeostasis in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.*, 2016, Vol. 22, no. 3, pp. 974-995.
17. Powrie F. Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2004, no. 1029, pp. 132-141.
18. Roberts C.W., Walker W., Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Rev. Clin. Microbiol.*, 2010, Vol. 14, pp. 476-488.
19. Suen J.L., Li H.T., Jong Y.J., Chiang B.L., Yen J.H. Altered homeostasis of CD4(+) FoxP3(+) regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology*, 2009, no. 127, pp. 196-205.
20. Walecki M., Eisel F., Klug J., Baal N., Paradowska-Dogan A., Wahle E., Hackstein H., Meinhardt A., Fijak M. Androgen receptor modulates Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T-cells. *Mol. Biol. Cell*, 2015, Vol. 26, no. 15, pp. 2845-2857.
21. Wang Y., Liu X.P., Zhao Z.B., Chen J.H., Yu C.G. Expression of CD4⁺ forkhead box P3 (FOXP3)⁺ regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *J. Dig. Dis.*, 2011, no. 12, pp. 286-294.
22. Yu T.Q., Saruta M., Avanesyan A., Fleshner R.F., Banham H.A., Papadakis A.K. Expression and functional characterization of FOXP3CD4 regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2007, Vol. 13, no. 2, pp. 191-199.

Авторы:

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

Постовалова Е.А. — научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Гао Юань — аспирант кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Добрынина М.Т. — к.б.н., старший преподаватель кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Authors:

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

Postovalova E.A., Research Associate, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Gao Yuan, Postgraduate Student, Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Dobrynina M.T., PhD (Biology), Senior Lecturer, Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Поступила 07.12.2018
Отправлена на доработку 26.12.2018
Принята к печати 10.04.2019

Received 07.12.2018
Revision received 26.12.2018
Accepted 10.04.2019

ИЗУЧЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ ИММУНОФЕНОТИПА И ПОКАЗАТЕЛЕЙ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ГИПЕРТРОФИЕЙ ГЛОТОЧНОЙ МИНДАЛИНЫ

Куртасова Л.М.^{1,2}, Шакина Н.А.², Лубнина Т.В.²

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

² КГАУЗ «Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия

Резюме. Цель исследования – изучение корреляционной зависимости между фенотипом и показателями активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови у детей раннего возраста с гипертрофией глоточной миндалины (ГГМ). Обследовано 57 детей в возрасте 1–3 лет с ГГМ. Контрольную группу составили 35 здоровых детей аналогичного возраста. Содержание CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺/56⁺ клеток в периферической крови определяли методом проточной цитофлуориметрии. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови изучали биолюминесцентным методом по А.А. Савченко и Л.Н. Сунцовой (1989). Корреляционный анализ показал, что у детей с ГГМ нарастает количество положительных связей, снижается сила корреляционной зависимости и появляются новые взаимосвязи между фенотипом и показателями активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови. У детей с ГГМ установлены особенности корреляционной картины взаимосвязей фенотипа и показателей активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови.

Ключевые слова: гипертрофия глоточной миндалины, лимфоцит, фенотип, ферменты, корреляция

STUDIES ON CORRELATIONS BETWEEN IMMUNOPHENOTYPE AND THE INDICES OF METABOLIC ENZYME ACTIVITY OF BLOOD LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH HYPERTROPHY OF THE PHARYNGEAL TONSILS

Kurtasova L.M.^{a,b}, Shakina N.A.^b, Lubnina T.V.^b

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

^b Krasnoyarsk Regional Center for AIDS Prevention and Control, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The objective of our study was to evaluate correlation between the immune phenotype and activity indices of NAD (P)-dependent dehydrogenases in peripheral blood lymphocytes in young children with hypertrophy of the pharyngeal tonsil (HPT). We have examined 57 children, 1–3 years of age, with hypertrophy

Адрес для переписки:

Куртасова Людмила Михайловна
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 1.
Тел.: 8 (391) 220-13-95.
Факс: 8 (391) 221-16-38.
E-mail: kurtasova.lm@mail.ru

Address for correspondence:

Kurtasova Ludmila M.
Krasnoyarsk State V. Voyno-Yasenetsky Medical University
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zheleznyak str., 1.
Phone: 7 (391) 220-13-95.
Fax: 7 (391) 221-16-38.
E-mail: kurtasova.lm@mail.ru

Образец цитирования:

Л.М. Куртасова, Н.А. Шакина, Т.В. Лубнина
«Изучение корреляционных связей иммунофенотипа и показателей активности метаболитических ферментов в лимфоцитах крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 165–170. doi: 10.15789/1563-0625-SOC-1806
© Куртасова Л.М. и соавт., 2020

For citation:

L.M. Kurtasova, N.A. Shakina, T.V. Lubnina “Studies on correlations between immunophenotype and the indices of metabolic enzyme activity of blood lymphocytes in children with hypertrophy of the pharyngeal tonsils”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 165–170. doi: 10.15789/1563-0625-SOC-1806
DOI: 10.15789/1563-0625-SOC-1806

of the pharyngeal tonsils (HPT). The control group consisted of 35 healthy children of the same age. The numbers of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺/56⁺ lymphoid cells in peripheral blood were determined by flow cytofluorimetry technique. Activity of NAD (P)-dependant dehydrogenases in peripheral blood lymphocytes was studied using bioluminescent method as described elsewhere (A. Savchenko, L. Suntsova, 1989). Correlation analysis has revealed an increase of positive correlations, a decrease of the correlation strength, and emergence of new connections between phenotype and activity indices of NAD (P)-dependent dehydrogenases in peripheral blood lymphocytes in children with hypertrophy of pharyngeal tonsils (HPT). Specific correlation patterns between the phenotype and activity indices of NAD (P)-dependent dehydrogenases in peripheral blood lymphocytes have been revealed in children with hypertrophy of pharyngeal tonsils (HPT).

Keywords: pharyngeal tonsils, hypertrophy, lymphocytes, phenotype, enzymes, correlation

Введение

Актуальной проблемой педиатрии и практического здравоохранения до сих пор остается патология лимфоглоточного кольца у детей. Практически каждый ребенок раннего возраста с часто рецидивирующими инфекциями респираторного тракта имеет клинические проявления хронического аденоидита [4, 5]. Необходимо отметить, что глоточная миндалина, входящая в состав лимфоглоточного кольца Вальдейера, как организованная лимфоидная ткань слизистых оболочек активно участвует в иммуногенезе [1].

В настоящее время не вызывает сомнений, что в основе функциональных проявлений лимфоцитов — основного структурно-функционального элемента иммунной системы — лежат их метаболические реакции. Уже через несколько секунд после контакта лимфоцита с антигеном или митогеном в клеточной мембране активируется Na⁺/K⁺-АТФаза, повышается уровень мембранных метилтрансфераз, возрастает поток Ca⁺⁺ внутрь клетки, который является необходимым условием для осуществления процессов приводящих к активации гуанилатциклазы и ингибированию аденилатциклазы [13].

С первых минут пролиферации в лимфоцитах увеличивается потребление аденозинтрифосфата (АТФ). Активация энергетического обмена во время пролиферативной активности проявляется не только в ускорении обмена АТФ, но и в увеличении синтеза пиридиннуклеотидов [14, 15]. Установлена зависимость экспрессии на лимфоцитах крови CD4⁺ и CD8⁺ антигенов от внутриклеточной концентрации аденозина и аденозиндифосфорной кислоты [6].

Высокую значимость в поддержании функциональной активности лимфоцитов имеют глутатион и ферменты глутатионового метаболизма. Обнаружено, что глутатион может непосредственно модулировать пролиферацию Т-лимфоцитов [10, 11, 12].

Наряду с изменением в активированных лимфоцитах интенсивности ионного транспорта, синтеза макроэргов и нуклеотидов, а также уровня дыхания, не остается постоянной и активность ферментов.

Особенно высокой информативностью для исследования метаболизма активированных лимфоцитов обладают окислительно-восста-

новительные ферменты. Это связано с тем, что, являясь основными переносчиками электронов в клетке, они осуществляют ключевые реакции клеточного метаболизма и координируют сопряженные метаболические пути [8].

Исследования, проведенные нами ранее, выявили у детей с гипертрофией глоточной миндалины изменения фенотипического спектра лимфоцитов периферической крови [3]. При изучении активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у детей раннего возраста с гипертрофией глоточной миндалины нами установлено повышение оттока субстратов через глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу на пластические процессы, снижение интенсивности анаэробного окисления глюкозы и роли малат-спартатного шунта в энергетическом внутриклеточном обмене, а также уменьшение активности глутатионредуктазы. В то же время в лимфоцитах крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины наблюдается высокий уровень субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, вносящему наибольший вклад в процессы внутриклеточного энергообразования. При этом уровень субстратного взаимодействия между циклом Кребса и реакциями аминокислотного обмена снижен [2, 3].

В связи с вышеизложенным целью исследования явилось изучение корреляционной зависимости между иммунофенотипом и показателями активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у детей раннего возраста с гипертрофией глоточной миндалины.

Материалы и методы

Обследовано 57 детей в возрасте от 1 года до 3 лет (средний возраст 2,26±0,76 лет) с гипертрофией глоточной миндалины (ГГМ), из них 32 (56,14%) мальчика и 25 (43,86%) девочек. Диагноз «гипертрофия глоточной миндалины» был установлен на основании жалоб, клинической (затруднение носового дыхания, дыхание через рот, отделяемое из носа, храп в ночное время) и эндоскопической (наличие аденоидных вегетаций II, III степени в полости носоглотки) картины. Включением в исследование являлось отсутствие терапии в течение месяца, предшествующего обследованию.

Контрольную группу составили 35 здоровых детей в возрасте 1-3 лет (средний возраст $2,14 \pm 0,84$ года), из них 19 (54,29%) мальчиков и 16 (45,71%) девочек.

Мононуклеары выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина [9]. Методом проточной цитофлуориметрии с использованием прибора FACSCallibur (Becton Dickinson, США) и реагентов Simultest IMK-lymphocyte Kit (США) определяли содержание $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$, $CD16^+/56^+$ в периферической крови.

В лимфоцитах периферической крови осуществляли биolumинесцентное определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ), НАД- и НАДН-зависимой лактатдегидрогеназы (НАДЛДГ, НАДНЛДГ), НАД- и НАДН-зависимой малатдегидрогеназы (НАДМДГ, НАДНМДГ), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ, НАДНГДГ), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ, НАДФНГДГ), НАД- и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДИЦДГ, НАДФИЦДГ), малатдегидрогеназы декарбоксилирующей (НАДФМДГ) и глутатионредуктазы (ГР) [7].

Активность исследуемых оксидоредуктаз выражали в ферментативных единицах ($1E = 1$ мкмоль/мин) на 10^4 клеток. Исследование проводили на ферментативном препарате NAD(P): FNM оксидоредуктаза-люцифераза из *Photobacterium leiognathi*. Измерение уровня биolumинесценции осуществляли на биolumинометре «БЛМ 8801» (Россия).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения показателей определялась с помощью метода Колмогорова—Смирнова (с поправкой Лиллиефорса). Количественные показатели, учитывая нормальное распределение, описывались с использованием средних арифметических значений (M) и стандартной ошибки среднего ($\pm m$). Для изучения статистической значимости различий между количественными признаками представленных групп применяли t -критерий Стьюдента. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Пирсону (r). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

При сравнении структуры корреляционных связей между показателями активности исследуемых оксидоредуктаз и фенотипом лимфоцитов периферической крови у детей контрольной группы (табл. 1) и у детей с ГГМ (табл. 2) обна-

ружено увеличение в корреляционной картине количества положительных связей в группе детей с ГГМ.

Результаты проведенного анализа выявили различия в корреляционной картине в сравниваемых группах детей. Так, у детей контрольной группы показатели активности НАДЛДГ имели положительную средней силы корреляционную связь с абсолютным числом В-лимфоцитов периферической крови ($r = 0,67$; $p < 0,001$).

У детей с ГГМ показатели активности НАДЛДГ находились в прямой взаимосвязи с абсолютным числом $CD8^+$ клеток ($r = 0,33$; $p < 0,05$).

Уровень активности НАДНМДГ в группе детей с ГГМ был положительно взаимосвязан с процентным содержанием и абсолютным числом $CD8^+$ клеток ($r = 0,33$; $p < 0,05$; $r = 0,32$; $p < 0,05$ соответственно). У детей контрольной группы показатели активности НАДНМДГ находились в обратной взаимосвязи с процентным содержанием В-лимфоцитов периферической крови и абсолютным числом $CD8^+$ клеток ($r = -0,39$; $p < 0,05$; $r = -0,43$; $p < 0,05$ соответственно).

Кроме того, различия в корреляционной картине, обнаруженные в сравниваемых группах детей, заключались в наличии у детей контрольной группы положительной взаимосвязи с высоким коэффициентом корреляции ($r = 0,74$; $p < 0,001$) между показателями активности обратной реакции НАДНГДГ и абсолютным числом зрелых Т-лимфоцитов ($CD3^+$), в то время как в группе детей с ГГМ отмечалась отрицательная с низким коэффициентом корреляции взаимосвязь активности прямой реакции НАДФГДГ с процентным содержанием зрелых Т-лимфоцитов ($r = -0,32$; $p < 0,05$).

Изучение взаимосвязей между показателями активности НАДНГДГ и фенотипом лимфоцитов периферической крови выявило однонаправленность корреляционных связей в наблюдаемых группах детей (табл. 1, 2). Однако количество и прочность корреляционных связей в контрольной группе оказались выше, чем в группе детей с ГГМ (табл. 1, 2).

Оценка корреляционной картины показала, что только у детей контрольной группы показатели активности НАДНЛДГ находились в корреляционной зависимости с фенотипом лимфоцитов крови (табл. 1). В то же время только в группе детей с ГГМ показатели активности малик-фермента (НАДФМДГ) коррелировали с фенотипом лимфоцитов периферической крови (табл. 2).

Следует отметить появление в группе детей с ГГМ корреляционных связей между показателями активности глутатионредуктазы и фенотипом лимфоцитов крови, отсутствующих у детей контрольной группы (табл. 1, 2).

С помощью корреляционного анализа мы попытались охарактеризовать взаимоотношения фенотипа и ферментного статуса лимфоцитов

ТАБЛИЦА 1. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АКТИВНОСТИ НАД(Ф)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ С ИММУНОФЕНОТИПОМ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ

TABLE 1. CORRELATIONS OF ACTIVITY INDICATORS OF NAD (P)-DEPENDANT DEHYDROGENASES WITH THE IMMUNOPHENOTYPE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN CHILDREN OF THE CONTROL GROUP

Иммунологический показатель Immunological indicator	Ферменты Enzymes	r	p
CD3 ⁺ , абс. abs.	НАДНЛДГ NADHLDH	-0,55	0,01
CD3 ⁺ , абс. abs.	НАДФНГДГ NADPHGDH	0,74	0,001
CD8 ⁺ , %	НАДНГДГ NADHGDH	-0,54	0,01
CD8 ⁺ , %	НАДНГДГ NADHGDH	-0,52	0,01
CD8 ⁺ , абс. abs.	НАДНМДГ NADHMDH	-0,43	0,05
CD19 ⁺ , %	НАДНМДГ NADHMDH	-0,39	0,05
CD19 ⁺ , %	НАДНЛДГ NADHLDH	-0,46	0,05
CD19 ⁺ , абс. abs.	НАДЛДГ NADLDH	0,67	0,001
CD16 ⁺ /56 ⁺ , %	НАДНЛДГ NADHLDH	0,41	0,05

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АКТИВНОСТИ НАД(Ф)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ С ИММУНОФЕНОТИПОМ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ГИПЕРТРОФИЕЙ ГЛОТОЧНОЙ МИНДАЛИНЫ

TABLE 2. CORRELATIONS OF ACTIVITY INDICATORS OF NAD (P)-DEPENDANT DEHYDROGENASES WITH THE IMMUNOPHENOTYPE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH HYPERTROPHY OF THE PHARYNGEAL TONSIL

Иммунологический показатель Immunological indicator	Ферменты Enzymes	r	p
CD19 ⁺ , %	НАДНГДГ NADHGDH	-0,33	0,05
CD19 ⁺ , абс. abs.	НАДФМДГ NADPMDH	0,34	0,05
CD3 ⁺ , %	НАДФГДГ NADPGDH	-0,32	0,05
CD3 ⁺ , абс. abs.	ГР GR	-0,33	0,05
CD4 ⁺ , %	ГР GR	-0,29	0,05
CD8 ⁺ , %	НАДНМДГ NADHMDG	0,33	0,05
CD8 ⁺ , абс. abs.	НАДНМДГ NADHMDH	-0,46	0,05
CD8 ⁺ , абс. abs.	НАДЛДГ NADLDH	0,33	0,05
CD8 ⁺ , абс. abs.	ГР GR	-0,41	0,05
CD16 ⁺ /56 ⁺	НАДФМДГ NADPMDH	0,29	0,05

периферической крови у детей раннего возраста с ГГМ.

Результаты проведенного анализа установили преобладание в корреляционной картине в группе детей с ГГМ положительных связей между изучаемыми показателями. При этом известно, что число корреляционных связей возрастает с усилением функциональной нагрузки на биологическую систему [8]. В то же время следует отметить невысокие коэффициенты корреляции выявленных взаимосвязей в группе детей с ГГМ, что отражает недостаточную прочность установленных корреляционных связей.

При оценке полученных данных обнаружено, что в группе детей с ГГМ глутатионредуктаза является метаболическим ферментом, имеющим наибольшее количество взаимосвязей с показателями, характеризующими фенотип лимфоцитов периферической крови. Можно предположить, что появление данных взаимосвязей определяется ролью фермента в реакциях внутриклеточного метаболизма. Так, известна роль глутатионредуктазы в процессах пролиферации Т-лимфоцитов [11, 12], что, вероятно, и характеризуется корреляционными связями данного энзима с количеством зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), CD4⁺ и CD8⁺ клеток.

По данным корреляционного анализа наибольшее количество связей с показателями активности исследуемых внутриклеточных фер-

ментов обнаружено у лимфоцитов с фенотипом CD8⁺, обладающих цитотоксическим потенциалом по отношению к инфицированным вирусами клеткам и играющих ведущую роль в специфической защите организма от внутриклеточных патогенов.

Таким образом, у детей раннего возраста с гипертрофией глоточной миндалины в лимфоцитах периферической крови выявлены взаимосвязи иммунофенотипа с показателями активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ.

Заключение

Результаты проведенного исследования установили особенности взаимоотношений между фенотипом и показателями активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови у детей раннего возраста с гипертрофией глоточной миндалины, определяемые количеством, направленностью и силой корреляционных связей.

Следует отметить, что полученные нами данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения метаболических механизмов, лежащих в основе функциональной активности клетки, в разных субпопуляциях лимфоидных клеток, а также о необходимости определить, какое клиническое значение имеют их изменения у детей с гипертрофией глоточной миндалины.

Список литературы / References

1. Борисенко Г.Н., Носуля Е.В., Никулин И.В. Клинико-эпидемиологические аспекты заболеваний верхних дыхательных путей у детей с рецидивирующей респираторной инфекцией // Российская ринология, 2014. Т. 22, № 4. С. 38-42. [Borisenko G.N., Nosulya E.V., Nikulin I.V. Upper respiratory tract diseases in children with recurrent respiratory infection: Clinical and epidemiological aspects. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2014, Vol. 22, no. 4, pp. 38-42. (In Russ.)]
2. Куртасова Л.М., Шмидт А.Р., Лубнина Т.В. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у детей раннего возраста с гипертрофией глоточной миндалины // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 4. С. 381-384. [Kurtasova L.M., Shmidt A.R., Lubnina T.V. NAD(P)-dependent dehydrogenase activity in peripheral blood lymphocytes of infants with enlargement of pharyngeal tonsils. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 4, pp. 381-384. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-4-381-384.
3. Куртасова Л.М., Шакина Н.А., Лубнина Т.В., Николаева А.И. Иммунологические показатели и ферментативная активность лимфоцитов периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины // Вестник оториноларингологии, 2017. Т. 82, № 2. С. 42-45. [Kurtasova L.M., Shakina N.A., Lubnina T.V., Nikolaeva A.I. The immunological characteristics and enzymatic activity of lymphocytes from the peripheral blood of the children presenting with pharyngeal tonsillar hypertrophy. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2017, Vol. 82, no. 2, pp. 42-45. (In Russ.)]
4. Левина А.С., Бабаченко И.В., Вожик А.А., Кветная А.С. Персистирующие инфекции у детей с хроническими заболеваниями ЛОР-органов: возможности этиотропной терапии // Вестник оториноларингологии, 2015. Т. 5. С. 46-50. [Levina A.S., Babachenko I.V., Vozhik A.A., Kvetnaya A.S. Persistent infections in the children suffering from chronic ENT diseases and the possibilities for their with etiotropic therapy. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2015, Vol. 5, pp. 46-50. (In Russ.)]
5. Очиллов Р.Т. Современные данные о проблеме лимфоэпителиального глоточного кольца // Российская оториноларингология, 2014. № 1. С. 169-171. [Ochilov R.T. New data on the problem lymphoepithelial pharyngeal ring. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2014, no. 1, pp. 169-171. (In Russ.)]
6. Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Макаров А.И., Бозиева Т.И. Изучение влияния медиаторов тканевого происхождения на экспрессию поверхностных антигенов лимфоцитов человека *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1995. № 2. С. 196-199. [Poryadin G.V., Salmasi Z.M., Kazimirsky A.N., Makarov A.I., Bozieva T.I. Effects of tissue mediators on the *in vitro* expression of

surface antigens by human lymphocytes. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1995, no. 2, pp. 196-199. (In Russ.)]

7. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолюминесцентным методом // Лабораторное дело, 1989. № 11. С. 23-25. [Savchenko A.A., Suntsova L.N. Highly sensitive determination of the dehydrogenase activity in peripheral blood lymphocytes using a bioluminescent method. *Laboratornoe delo* = *Laboratory Diagnostic*, 1989, no. 11, pp. 23-25. (In Russ.)]

8. Савченко А.А., Борисов А.Г. Основы клинической иммунометаболизма. Новосибирск: Наука, 2012. 263 с. [Savchenko A.A., Borisov A.G. Basis of the clinical immunometabolism. Novosibirsk: Science, 2012. 263 p.]

9. Самсыгина Г.А. Современное лечение острых респираторных заболеваний у детей // Педиатрия, 2013. Т. 92, № 3. С. 38-42. [Samsigina G.A. Modern treatment of acute respiratory diseases in children. *Pediatrya* = *Pediatrics*, 2013, Vol. 92, no. 3, pp. 38-42. (In Russ.)]

10. Boyum A. Isolation of lymphocytes from blood and marrow. *Scand. Clin. Lab. Invest*, 1968, Vol. 21, no. 97, pp. 77-80.

11. Hamed Y.B., Medydoub A., Kara B.M., Merzour H., Villemain D., Narce M. 5,6-dihydro-2H-pyranones and 5,6-dihydro-2H-pyridones and their derivatives modulate *in vitro* human T lymphocyte function. *Mol. Cell. Biochem.*, 2012, Vol. 360, no. 1-2, pp. 23-33.

12. Pallardo F.V., Markovic J., Garcia-Gimenez J.L., Vina J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol. Aspects. Med.*, 2009, Vol. 30, no. 1, pp. 77-85.

13. Roth S., Droge W. Glutathione reverses the inhibition of T cell responses by superoptimal numbers of «Nonprofessional» antigen presenting cells. *Cell. Immunol.*, 1994, Vol. 155, no. 1, pp. 183-194.

14. Toldi G., Kaposi A., Zsembery A., Treszl A., Tilassay T., Vasarhelyi B. Human Th 1 and Th 2 lymphocytes are distinguished by calcium flux regulation during the first 10 min of lymphocyte activation. *Zimmunobiology*, 2012, Vol. 217, no. 1, pp. 37-43.

15. Vyas S., Roberti I. Lymphocyte ATP immune cell function assay in pediatric renal transplants: is it useful? *Transplant. Proc.*, 2011, Vol. 43, no. 10, pp. 3675-3678.

16. Zhou H., Wu Z., Ma L., Wu W., Yang S., Wang Q., Yuan X., Wu L., Lin X., Tan J. Assessing immunologic function through CD4 T-lymphocyte adenosine triphosphate levels by ImmuKnow assay in Chinese patients following renal transplantation. *Transplant. Proc.*, 2011, Vol. 43, no. 7, pp. 2574-2578.

Авторы:

Куртасова Л.М. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; КГАУЗ «Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия

Шакина Н.А. — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики отделения иммунологических и гематологических исследований КГАУЗ «Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия

Лубнина Т.В. — врач-педиатр лечебно-консультативного отделения КГАУЗ «Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия

Authors:

Kurtasova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasensky Medical University; Krasnoyarsk Regional Center for AIDS Prevention and Control, Krasnoyarsk, Russian Federation

Shakina N.A., PhD (Medicine), Doctor for Clinical Laboratory Diagnostics, Department of Immunological and Haematological Research, Krasnoyarsk Regional Center for AIDS Prevention and Control, Krasnoyarsk, Russian Federation

Lubnina T.V., Clinical Pediatrician, Clinical Ambulance Department, Krasnoyarsk Regional Center for AIDS Prevention and Control, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 25.07.2019
Принята к печати 27.09.2019

Received 25.07.2019
Accepted 27.09.2019

АССОЦИИИ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ С ПОЛИМОРФНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

Поленок Е.Г.¹, Гордеева Л.А.¹, Мун С.А.¹, Воронина Е.Н.²,
Колпинский Г.И.³, Луценко В.А.⁴, Брежнева Е.В.⁴, Костянко М.В.⁵,
Вафин И.А.⁶, Глушков А.А.⁷

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

² ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

³ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

⁴ ГБУЗ Кемеровской области «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

⁶ ГКУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия

⁷ ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. Ранее были обнаружены ассоциации антител классов А и G, специфичных к бензо[а]пирену (Bp), эстрадиолу (Es) и прогестерону (Pg), с раком молочной железы (РМЖ) у женщин в постменопаузе. Индивидуальные соотношения IgA-Bp/IgA-Pg, IgG-Bp/IgG-Pg, IgG-Es/IgG-Pg и IgG-Es/IgG-Pg также были взаимосвязаны с риском возникновения РМЖ. Предположили, что образование антител к химическим канцерогенам и стероидным гормонам обусловлено генетическим полиморфизмом цитокинов.

Цель исследования — выявить предполагаемые ассоциации антител к Bp, Es и Pg и их индивидуальных соотношений с полиморфизмом в генах *IL1RN* (rs4251961), *IL1B* (rs16944), *IL6* (rs1800795, rs1800796, rs1554606), *IL8* (rs4073), *TNFA* (rs1800629) и *CD40* (rs6074022) у здоровых женщин и больных РМЖ в постменопаузе.

Исследовали сывороточные антитела классов А и G к Bp, Es и Pg у 470 здоровых женщин и 995 больных РМЖ с помощью неконкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве адсорбированных на пластике антигенов использовали конъюгаты Bp, Es и Pg с бычьим сывороточным альбумином. Для выявления связавшихся с гаптенами антител использовали меченные пероксидазой хрена козы антитела против IgA и IgG человека. Генетические полиморфизмы цитокинов исследовали с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Е.Г. Поленок, Л.А. Гордеева, С.А. Мун, Е.Н. Воронина,
Г.И. Колпинский, В.А. Луценко, Е.В. Брежнева,
М.В. Костянко, И.А. Вафин, А.А. Глушков «Ассоциации
антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону
с полиморфными вариантами генов цитокинов
у женщин в постменопаузе» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 171-180.
doi: 10.15789/1563-0625-AOA-1794

© Поленок Е.Г. и соавт., 2020

For citation:

E.G. Polenok, L.A. Gordeeva, S.A. Mun, E.N. Voronina,
G.I. Kolpinsky, V.A. Lutsenko, E.V. Brezhneva,
M.V. Kostyanko, I.A. Vafin, A.A. Glushkov "Association of
antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone with
gene polymorphisms of cytokines in postmenopausal women",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 1, pp. 171-180.
doi: 10.15789/1563-0625-AOA-1794

DOI: 10.15789/1563-0625-AOA-1794

У здоровых женщин обнаружены ассоциации исследуемых антител и их соотношений с полиморфизмом в генах *IL1RN* (rs4251961), *IL6* (rs1800795), *TNFA* (rs1800629) и *CD40* (rs6074022). Высокие значения индивидуальных соотношений IgA-Bp/IgA-Pg ($p = 0,0001$), IgG-Bp/IgG-Pg ($p < 0,0001$), IgG-Es/IgG-Pg ($p = 0,0003$) были ассоциированы с аллелем С гена *IL1RN*. Повышенные уровни IgG-Es чаще встречались у носителей аллеля G гена *IL6* ($p = 0,007$) и у носителей аллеля С гена *CD40* ($p = 0,005$). Повышенные уровни IgA-Pg были ассоциированы с аллелем А гена *TNFA* ($p = 0,008$). У больных РМЖ выявлены ассоциации антител только с полиморфизмом в гене *CD40* (rs6074022). Повышенные уровни IgG-Es чаще встречались у носителей аллеля Т гена *CD40* ($p = 0,007$).

Таким образом, впервые подтвердили участие цитокинов в регуляции образования антител, специфичных к химическим канцерогенам и стероидным гормонам у здоровых женщин и больных РМЖ. Дальнейшие исследования антител к Bp, Es и Pg в сочетании с анализом полиморфизма в генах цитокинов позволят оптимизировать диагностику индивидуальных рисков возникновения гормонозависимых злокачественных опухолей у человека.

Ключевые слова: цитокины, антитела, бензо[а]пирен, эстрадиол, прогестерон, рак молочной железы

ASSOCIATION OF ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE WITH GENE POLYMORPHISMS OF CYTOKINES IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

Polenok E.G.^a, Gordeeva L.A.^a, Mun S.A.^a, Voronina E.N.^b,
Kolpinsky G.I.^c, Lutsenko V.A.^d, Brezhneva E.V.^d, Kostyanko M.V.^e,
Vafin I.A.^f, Glushkov A.A.^g

^a Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

^b Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^c Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

^d Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^e Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

^f Regional Center of Blood, Kemerovo, Russian Federation

^g Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Previous studies reported some associations between IgA and IgG antibodies specific to benzo[a]pyrene (Bp), estradiol (Es) and progesterone (Pg), and breast cancer (BC) in postmenopausal women. Likewise, the individual ratios of these antibodies (IgA-Bp/IgA-Pg, IgG-Bp/IgG-Pg, IgG-Es/IgG-Pg, IgG-Es/IgG-Pg) were associated with BC. It was suggested that development of antibodies to chemical carcinogens and steroid hormones was determined by functional polymorphisms of cytokine genes. The purpose of this study was to identify the suggested associations of antibodies to Bp, Es, Pg, and their individual ratios to the following gene polymorphisms: *IL1RN* (rs4251961), *IL1B* (rs16944), *IL6* (rs1800795, rs1800796, rs1554606), *IL8* (rs4073), *TNFA* (rs1800629) and *CD40* (rs6074022) detected in postmenopausal healthy women and BC patients.

The serum IgA and IgG antibodies specific to Bp, Es and Pg were studied in 470 healthy women and 995 BC patients by non-competitive solid phase immunoassay. The conjugates of Bp, Es, Pg with bovine serum albumin were used as adsorbed antigen. The goat antibodies against human IgA or IgG conjugated with horseradish peroxidase were used for the detection of bound hapten-specific antibodies. Cytokine gene polymorphisms were analyzed by the real-time PCR.

Associations between the studied antibodies and their ratios with the gene polymorphisms in *IL1RN* (rs4251961), *IL6* (rs1800795), *TNFA* (rs1800629) and *CD40* (rs6074022) were found in healthy women. Higher individual ratios of IgA-Bp/IgA-Pg ($p = 0.0001$), IgG-Bp/IgG-Pg ($p < 0.0001$), IgG-Es/IgG-Pg ($p = 0.0003$) were associated with the allele C gene *IL1RN*. The higher IgG-Es levels were more common in the persons with allele G gene *IL6* ($p = 0.007$), and with C allele of *CD40* gene ($p = 0.005$). The high IgA-Pg levels were

associated with A allele gene of *TNFA* ($p = 0.008$). Associations of antibodies were found only with genes polymorphisms in *CD40* (rs6074022) in BC patients. Higher IgG-Es levels were more common in persons with allele T gene *CD40* ($p = 0.007$).

In conclusion, we revealed the participation of cytokines in immune regulation of antibody genesis for environmental chemical carcinogens and endogenous steroid hormones in healthy women and BC patients. The future investigations of antibodies specific to Bp, Es and Pg combined with the analysis genes polymorphisms in cytokines will be useful for detection of the individual hormone-dependent cancer risks in humans.

Keywords: cytokines, antibodies, benzo[a]pyrene, estradiol, progesterone, breast cancer

Работа выполнена в рамках проекта VI.59.1.1 Программы фундаментальных научных исследований СО РАН (гос. задание № 0352-2019-0011).

Введение

В экспериментах по иммунизации животных конъюгатами полициклических ароматических углеводородов или стероидных гормонов с макронесителями показано образование гаптен-специфических антител и модуляция биологических эффектов этих химических соединений [6, 7, 8, 10, 11]. В естественных условиях у человека индукторами специфических антител могут быть аддукты метаболитов указанных веществ с ДНК [5, 14, 15]. Были обнаружены ассоциации антител, специфичных к бензо[а]пирену (Bp), эстрадиолу (Es) и прогестерону (Pg) с раком молочной железы (РМЖ) у женщин в постменопаузе [1, 9].

С другой стороны, некоторыми исследователями обнаружены ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов с РМЖ [12, 13].

Учитывая общеизвестное влияние цитокинов на антителогенез, представляется целесообразным изучить взаимосвязи уровней антител к химическим канцерогенам и стероидным гормонам с генетическим полиморфизмом цитокинов и особенности таких взаимосвязей при онкологических заболеваниях.

Цель настоящей работы — выявить предполагаемые ассоциации уровней антител, специфичных к Bp, Es и Pg, с вариантами генов цитокинов *IL1RN* (rs4251961), *IL1B* (rs16944), *IL6* (rs1800795, rs1800796, rs1554606), *IL8* (rs4073), *TNFA* (rs1800629) и гена поверхностного рецептора В-лимфоцитов *CD40* (rs6074022) у здоровых женщин и больных РМЖ в постменопаузе.

Материалы и методы

В обследовании приняли участие 1465 женщин в постменопаузе. Из них 995 — с диагнозом «инвазивная карцинома молочной железы», которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз «РМЖ» в каждом случае был подтвержден гистологически. У большинства женщин была выяв-

лена I и II стадии заболевания (37,3 и 43,6%), III и IV стадии составили 18,2 и 0,9% соответственно. Медиана возраста женщин в исследуемой группе — 63 года (интерквартильный размах — 58–69).

В группу сравнения были включены 470 условно здоровых женщин, проживающих на территории Кемеровской области, и доноры Кемеровского центра крови без патологии молочной железы. Медиана возраста женщин в группе сравнения — 57 лет (интерквартильный размах — 53–61).

Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все женщины, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем. Образцы сыворотки крови обследуемых забирались в аликвоты и хранились при -70°C .

Исследование антител классов А и G к Bp, Es и Pg проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа в собственной модификации [2]. В качестве антигена на полистирольные иммунологические планшеты были иммобилизованы конъюгаты Bp, Es и Pg с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Конъюгат Bp-BSA был получен согласно ранее описанной методике. Конъюгат Es-BSA был синтезирован путем присоединения BSA к эстрадиолхинонам, полученным окислением Es солью Фреми. Конъюгат Pg-BSA был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидроксипрогестерона и BSA карбодиимидным способом. Связавшиеся антитела выявляли с помощью козьих антител против IgA(G) человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США) в разведении 1:10000. Регистрацию адсорбированных на планшете антител проводили с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (ТМБ, США), на фотометре (Униплан, Россия) при длине волны 450 нм. Уровень антител к гаптенам выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$$\text{IgA(G)-X} = (\text{OD}_{\text{X-BSA}} - \text{OD}_{\text{BSA}}) / \text{OD}_{\text{BSA}}$$
где X = Bp, Es, Pg; $\text{OD}_{\text{X-BSA}}$ — связывание антител с конъюгатом гаптен-BSA, OD_{BSA} — фоно-

вое связывание антител с BSA. Величина уровня IgA(G)-X показывала, во сколько раз связывание с гаптеном превышает связывание с белком-носителем.

Генотипирование

Образцы ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью метода фенол-хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом, образцы ДНК хранили при -20 °С.

Типирование полиморфизма гена *IL6* rs1800795 осуществляли с помощью метода асимметричной ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченого олигонуклеотидного зонда. Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: начальная денатурация

(96 °С — 3 мин); затем 54 цикла, включающих денатурацию при 96 °С — 6 с, отжиг праймеров при 56 °С — 6 с и последующую элонгацию при 72 °С — 6 с; регистрировали кривые плавления в диапазоне температур 35-85 °С, повышая температуру на 0,5 °С в каждом цикле от начальной температуры, каждый шаг сопровождался регистрацией флуоресцентного сигнала в диапазоне, соответствующем интервалу флуорофора. Общий объем реакционной смеси составил 20 мкл: 10 mM Трис-HCl (pH 8,9), 55 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂, 0,05% Tween 20, 0,2 mM dNTP, 20-100 ng ДНК, 1 ед. акт. KlenTaq-ДНК-полимеразы, растворы олигонуклеотидных праймеров и зонда в следующих концентрациях: лимитирующий праймер — 0,1 mM (5'-TGGGGCTGATTGGAAACCT-3'),

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ИССЛЕДОВАНИИ

TABLE 1. SEQUENCE OF PRIMERS AND PROBES USED IN THE STUDY

Полиморфизм Polymorphism	Праймеры Primers	Последовательность праймеров Primer sequence	Последовательность зондов Probe sequence
-511T>C <i>IL1B</i> (rs16944)	прямой direct	5'-ccccagccaagaagggtca-3'	5'-R6G-ctctgcctcGggagctctc-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-ttgagggtgtgggtctctac-3'	5'-Fam-ctctgcctcAggagctctc-BHQ-3'
+1018T>C <i>IL1RN</i> (rs4251961)	прямой direct	5'-cggtgagccctaagtctaag-3'	5'-R6G-atggacctgGtgctatctgc-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-cttcagacctcattttgacagc-3'	5'-Fam-atggacctgAtgctatctgc-BHQ-3'
g.4481G>C <i>IL6</i> (rs1800796)	прямой direct	5'-catctgagttctctgtgtctg-3'	5'-R6G-caacagccCctcacagg-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-cgagacgccttgaagtaactg-3'	5'-Fam-caacagccGctcacagg-BHQ-3'
g.6942T>G <i>IL6</i> (rs1554606)	прямой direct	5'-caactgtcaaatgtttaaactcc-3'	5'-Fam-ccctgAgagtacctttccc-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-ccaggggcagccagagag-3'	5'-Hex-ccctgCgagtacctttccc-BHQ-3'
-251A>T <i>IL8</i> (rs4073)	прямой direct	5'-tgttctaacacctgccactct-3'	5'-Fam-aagcatacaAttgataattc-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-acatttaaaatactgaagctccaca-3'	5'-Hex-aagcatacaTttgataattc-BHQ-3'
-1082A>T <i>IL10</i> (rs1800896)	прямой direct	5'-cacaatccaagacaacactact -3'	5'-R6G-cttccccCtcccaaagaagc -BHQ-3'
	обратный reverse	5'-gataggagggtccctactttcc -3'	5'-Fam-cttccccTtcccaaagaagc -BHQ-3'
-308G>A <i>TNFA</i> (rs1800629)	прямой direct	5'-gtcctacacacaaatcagtcagt-3'	5'-Fam-tcctccctgctcTgattc-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-ttggggacacacaagcatca-3'	5'-R6G-tcctccctgctcCgattc-BHQ-3'
g.46111557C>T <i>CD40</i> (rs6074022)	прямой direct	5'-ccctgcactgtctccagg-3'	5'-FAM-ctgccatgtcAtgaggacac-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-atacggacttctccataggctg-3'	5'-R6G-ctgccatgtcGtaggacac-BHQ-3'

избыточный праймер — 1 mM (5'-AGGAAGAGTG GTTCTGCTTCT-3') и зонд — 0,1 mM (5'-R6G-CTTTAGCATcGCAAGACA-BHQ-3').

Полиморфизм гена *IL1RN* (rs2234663) детектировали с помощью электрофоретического разделения продуктов амплификации [3]. VNTR аллели в гене *IL1RN* обозначали следующим образом: аллель *IL1RN*1* содержал четыре tandemных повтора по 86 н. п.; аллель *IL1RN*2* — два tandemных повтора; аллель *IL1RN*3* — пять tandemных повтора; аллель *IL1RN*4* — три tandemных повтора. Амплификацию проводили с помощью термоциклера «Терцик» (НПФ «ДНК-Технология», Россия).

Генотипирование остальных полиморфных локусов *IL1B* (rs16944), *IL1RN* (rs4251961), *IL6* (rs1800796, rs1554606), *IL8* (rs4073), *IL10* (rs1800896), *TNFA* (rs1800629) и *CD40* (rs6074022) выполняли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов. Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: начальная денатурация (96 °C — 3 мин); затем 50 циклов, включающих денатурацию при 96 °C — 8 с, отжиг праймеров при 58 °C — 40 с и последующую элонгацию при 72 °C — 8 с. Общий объем реакционной смеси был 20 мкл. Смесь содержала: 65 mM Трис-НCl (pH 8,9), 24 mM (NH₄)₂SO₄; 3,0 mM MgCl₂, 0,05% Tween 20, 0,2 mM dNTP, 20-100 ng ДНК; 300 mM каждого праймера; 100-200 nM TaqMan-зондов (табл. 1); 0,5 ед. акт. термостабильной Taq-полимеразы. Амплификацию проводили с помощью термоциклера CFX-96 (Bio-Rad, США).

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США), онлайн-калькуляторов http://gen-exp.ru/calculator_or.php, <https://www.snpstats.net/start.htm>. Соответствие частот генотипов изучаемых генов равновесию Харди–Вайнберга (HWE) оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона. Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$. Ненормальный характер распределения количественных показателей определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявляли с помощью непараметрического критерия χ^2 с поправкой Йейтса (Yates) на непрерывность вариации. За критический уровень значимости принималось значение $p < 0,05$. Силу ассоциации антител и полиморфных вариантов изучаемых генов у здоровых женщин и больных РМЖ оценивали с помощью величины отношения шансов (odds ratio, OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости. В качестве базовой модели использовали аддитивную модель наследования признака.

Результаты и обсуждение

Сначала отдельно для каждой из исследуемых групп рассчитали медианы (Me) уровней антител классов А и G, специфичных к Bp, Es и Pg, а также Me индивидуальных соотношений антител Bp/Pg и Es/Pg. Затем провели анализ частот встречаемости низких ($\leq$ Me) и высоких ($>$ Me) значений уровней антител и их соотношений у носителей отдельных генотипов и аллелей исследуемых цитокинов у здоровых женщин и у больных РМЖ. Рассчитали отношение шансов (OR) обнаружения высоких уровней антител и высоких значений их соотношений у носителей отдельных аллелей исследуемых генов цитокинов.

Ассоциации антител к Bp, Es и Pg с полиморфизмом генов исследуемых цитокинов у здоровых женщин

В таблице 2 приведено распределение здоровых женщин по частоте встречаемости низких и высоких значений уровней исследуемых антител и их индивидуальных соотношений в ассоциации с отдельными генотипами и аллелями генов цитокинов и гена поверхностного рецептора В-лимфоцитов *CD40*. Представлены только выявленные статистически значимые ($p < 0,05$) взаимосвязи.

Обнаружены искомые ассоциации генетического полиморфизма *IL1RN* (rs4251961) с уровнями IgA-Bp, а также с соотношениями IgA-Bp/IgA-Pg, IgG-Bp/IgG-Pg, IgG-Es/IgG-Pg. Высокие уровни IgA-Bp и высокие значения указанных соотношений были взаимосвязаны с аллелем С (OR = 1,4-1,9) гена *IL1RN*.

Генетический полиморфизм *IL1B* (rs16944) был статистически значимо взаимосвязан с соотношениями IgA-Es/IgA-Pg и IgG-Es/IgG-Pg ($p = 0,03-0,04$). Повышенные значения указанных соотношений чаще встречались у носителей аллеля Т гена *IL1B*.

Полиморфные локусы в гене *IL6* были статистически значимо ассоциированы с IgG-Es (rs1800795, $p = 0,007$ и rs1554606, $p = 0,03$). И в том, и другом случае высокие уровни IgG-Es были взаимосвязаны с аллелем G (OR = 1,5-1,3 соответственно).

Полиморфизм гена *TNFA* (rs1800629) был взаимосвязан с IgA-Pg ($p = 0,008$). У носителей аллеля А чаще встречались высокие уровни IgA-Pg (OR = 1,8).

Полиморфизм гена *CD40* (rs607022) ассоциирован с IgG-Es ($p = 0,005$). Высокие уровни IgG-Es были взаимосвязаны с аллелем С (OR = 1,5).

Ассоциации антител к Bp, Es и Pg с полиморфными вариантами генов исследуемых цитокинов у больных РМЖ

У больных РМЖ (табл. 3) обнаружены статистически значимые взаимосвязи полиморфизма

ТАБЛИЦА 2. ЧИСЛО СЛУЧАЕВ (n) И ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ (%) НИЗКИХ ($\leq Me$) И ВЫСОКИХ УРОВНЕЙ ($> Me$) ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИТЕЛ И ИХ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СООТНОШЕНИЙ У ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН ПРИ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОТИПАХ И АЛЛЕЛЯХ ЦИТОКИНОВ

TABLE 2. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF THE LOW ($\leq Me$) AND HIGH ($> Me$) STUDIED ANTIBODIES LEVELS AND INDIVIDUAL ANTIBODIES RATIOS IN HEALTHY WOMEN IN RELATION TO CYTOKINES GENOTYPES AND ALLELES

Гены Генотипы Аллели Genes Genotypes Alleles	Антитела и их соотношения Antibodies, ratios		p-value
	n/%	n/%	OR (95%CI)
+1018T>C <i>IL1RN</i> (rs4251961) TT TC CC T C	IgA-Bp $\leq 2,5$	IgA-Bp $> 2,5$	0,01
	133/55,6 87/36,4 19/8,0	104/45,0 99/42,9 28/12,1	
	353/74,0 125/26,0	307/66,0 155/34,0	
			0,7 (0,5-0,9) 1,4 (1,1-1,9)
+1018T>C <i>IL1RN</i> (rs4251961) TT TC CC T C	IgA-Bp/IgA-Pg $\leq 1,0$	IgA-Bp/IgA-Pg $> 1,0$	0,0001
	139/59,1 79/33,6 17/7,2	98/41,7 107/45,5 30/12,8	
	357/76,0 113/24,0	303/64,0 167/36,0	
			0,6 (0,4-0,8) 1,7 (1,3-2,3)
+1018T>C <i>IL1RN</i> (rs4251961) TT TC CC T C	IgG-Bp/IgG-Pg $\leq 1,2$	IgG-Bp/IgG-Pg $> 1,2$	< 0,0001
	144/60,5 78/32,8 16/6,7	93/40,1 108/46,5 31/13,4	
	366/77,0 110/23,0	294/63,0 170/37,0	
			0,5 (0,4-0,7) 1,9 (1,5-2,6)
+1018T>C <i>IL1RN</i> (rs4251961) TT TC CC T C	IgG-Es/IgG-Pg $\leq 1,4$	IgG-Es/IgG-Pg $> 1,4$	0,0003
	141/58,3 83/34,3 18/7,4	96/42,1 103/45,2 29/12,7	
	365/75,0 119/25,0	295/65,0 161/35,0	
			0,6 (0,5-0,8) 1,7 (1,3-2,2)
-511T>C <i>IL1B</i> (rs16944) CC CT TT C T	IgA-Es/IgA-Pg $\leq 1,1$	IgA-Es/IgA-Pg $> 1,1$	0,04
	123/50,0 103/41,9 20/8,1	90/40,2 110/49,1 24/10,7	
	349/71,0 143/29,0	290/65,0 158/35,0	
			0,8 (0,6-0,99) 1,3 (1,01-1,80)
-511T>C <i>IL1B</i> (rs16944) CC CT TT C T	IgG-Es/IgG-Pg $\leq 1,4$	IgG-Es/IgG-Pg $> 1,4$	0,04
	121/50,0 102/42,1 19/7,8	92/40,0 111/48,7 25/11,0	
	344/71,0 140/29,0	295/65,0 161/35,0	
			0,8 (0,60-0,98) 1,3 (1,02-1,80)

Гены Генотипы Аллели Genes Genotypes Alleles	Антитела и их соотношения Antibodies, ratios		p-value
	n/%	n/%	OR (95%CI)
-174G>C <i>IL6</i> (rs1800795) GG GC CC G C	IgG-Es ≤ 5,8	IgG-Es > 5,8	0,007
	54/25,0 116/53,7 46/21,3	61/33,9 99/55,0 20/11,1	
	224/52,0 208/48,0	221/61,0 139/39,0	
			1,5 (1,10-1,96) 0,7 (0,5-0,9)
g.6942T>G <i>IL6</i> (rs1554606) GG GT TT G T	IgG-Es ≤ 5,8	IgG-Es > 5,8	0,03
	58/24,4 128/53,8 52/21,9	71/30,6 129/55,6 32/13,8	
	244/51,0 232/49,0	271/58,0 193/42,0	
			1,3 (1,03-1,70) 0,8 (0,60-0,97)
-308G>A <i>TNFA</i> (rs1800629) GG GA AA G A	IgA-Pg ≤ 2,5	IgA-Pg > 2,5	0,008
	200/85,5 33/14,1 1/0,4	178/75,4 56/23,7 2/0,8	
	433/93,0 35/7,0	412/87,0 60/13,0	
			0,6 (0,4-0,9) 1,8 (1,2-2,8)
g.46111557C>T <i>CD40</i> (rs6074022) TT CT CC T C	IgG-Es ≤ 5,8	IgG-Es > 5,8	0,005
	145/60,9 84/35,3 9/3,8	120/51,7 88/37,9 24/10,3	
	374/79,0 102/21,0	328/71,0 136/29,0	
			0,7 (0,5-0,9) 1,5 (1,1-2,0)

в генах *IL1RN* (rs2234663), *IL6* (rs1800795), *IL8* и *CD40* с IgA-Pg, IgG-Es и с соотношениями IgA-Es/IgA-Pg и IgG-Es/IgG-Pg ($p = 0,02-0,04$). В то же время полиморфизм гена *CD40* оказался ассоциированным с IgG-Es ($p = 0,007$). Высокие уровни IgG-Es выявлялись чаще у больных РМЖ с аллелем Т (OR = 1,3).

Впервые выявлены ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов с образованием антител, специфичных к химическим канцерогенам окружающей среды и эндогенным стероидным гормонам. Несмотря на схожесть химической структуры этих низкомолекулярных соединений (особенно Es и Pg), влияние цитокинов на образование специфических антител проявлялось по-разному.

Например, у здоровых женщин полиморфные локусы генов *IL6* (rs1800795, rs1554606) и *CD40* были ассоциированы с уровнями антител к Es, но

не к Pg и к Bp. Полиморфизм гена *TNFA* оказал-ся взаимосвязанным с уровнями антител к Pg, но не к Es и Bp. При этом указанные полиморфизмы были ассоциированы только с одним из классов антител – А или G.

Также у здоровых женщин полиморфизм *IL1RN* был ассоциирован с уровнями только IgA-Bp, но не с IgA или IgG к Pg. При этом сильные взаимосвязи имели место с индивидуальными соотношениями IgA-Bp/IgA-Pg, IgG-Bp/IgG-Pg, IgG-Es/IgG-Pg.

У больных РМЖ искомые ассоциации оказались значительно слабее, чем у здоровых женщин (с низким уровнем статистической значимости), за исключением *CD40*, который был взаимосвя-зан с образованием IgG-Es.

Причины перечисленных особенностей как у здоровых женщин, так и у больных РМЖ остаются неизвестными. Поскольку в образовании антител любой специфичности участвует

ТАБЛИЦА 3. ЧИСЛО СЛУЧАЕВ (n) И ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ (%) НИЗКИХ ($\leq Me$) И ВЫСОКИХ УРОВНЕЙ ($> Me$) ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИТЕЛ И ИХ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СООТНОШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОТИПАХ И АЛЛЕЛЯХ ЦИТОКИНОВ

TABLE 3. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF THE LOW ($\leq Me$) AND HIGH ($> Me$) STUDIED ANTIBODIES LEVELS AND INDIVIDUAL ANTIBODIES RATIOS IN BREAST CANCER PATIENTS IN RELATION TO CYTOKINES GENOTYPES AND ALLELES

Гены Генотипы Аллели Genes Genotypes Alleles	Антитела и их соотношения Antibodies, ratios		p-value
	n/%	n/%	OR (95%CI)
IL1RN (rs2234663) rs2234663 *1/*1 *1/*2 *2/*2 *1/*3+*2/*3+*1/*5 *1 *2	IgA-Pg $\leq 2,0$	IgA-Pg $> 2,0$	0,04
	99/48,7 87/42,9 15/7,4 2/1,0	112/58,3 59/30,7 12/6,3 9/4,7	
	286/70,1 118/2,9	289/75,3 86/22,4	
			1,4 (1,01-1,90) 0,7 (0,50-0,99)
174G>C IL6 (rs1800795) GG GC CC G C	IgA-Pg $\leq 2,0$	IgA-Pg $> 2,0$	0,03
	146/29,7 235/47,8 111/22,6	175/34,8 239/47,5 89/17,7	
	527/54,0 457/46,0	589/59,0 417/41,0	
			1,2 (1,03-1,50) 0,8 (0,70-0,97)
-251A>T IL8 (rs4073) TT AT AA T A	IgG-Es/IgG-Pg $\leq 1,6$	IgG-Es/IgG-Pg $> 1,6$	0,02
	167/33,3 235/46,9 99/19,8	115/27,6 197/47,2 105/25,2	
	569/57,0 433/43,0	427/51,0 407/49,0	
			0,8 (0,70-0,96) 1,3 (1,04-1,50)
g.46111557C>T CD40 (rs6074022) TT CT CC T C	IgA-Es/IgA-Pg $\leq 1,4$	IgA-Es/IgA-Pg $> 1,4$	0,03
	289/55,0 206/39,2 30/5,7	290/61,7 160/34,0 20/4,3	
	784/75,0 266/25,0	740/79,0 200/21,0	
			1,3 (1,02-1,69) 0,8 (0,70-0,98)
g.46111557C>T CD40 (rs6074022) TT CT CC T C	IgG-Es $\leq 5,8$	IgG-Es $> 5,8$	0,007
	273/53,9 205/40,4 29/5,7	306/62,7 161/33,0 21/4,3	
	751/74,0 263/26,0	773/79,0 203/21,0	
			1,3 (1,08-1,64) 0,8 (0,6-0,9)

весь спектр цитокинов и поверхностных рецепторов лимфоцитов (в том числе система *HLA*, очевидно, обеспечивающая распознавание низкомолекулярных гаптен в составе макромолекулярных аддуктов), дальнейшие исследования

генетических основ образования антител против химических канцерогенов и стероидных гормонов целесообразно проводить с использованием методов многофакторного регрессионного анализа на больших выборках.

Список литературы / References

1. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Костянко М.В., Антонов А.В., Титов В.А., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А. Иммунологический дисбаланс при раке молочной железы и раке легкого у женщин в постменопаузе // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 927-934. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Titov V.A., Verzhbitskaya N.E., Vafin I.A. Immunological imbalance in breast cancer and lung cancer in postmenopausal women. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 927-934. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-927-934.
2. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Мун С.А., Гордеева Л.А., Костянко М.В., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А. Индивидуальный иммунологический фенотип и риск рака молочной железы у женщин в постменопаузе // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13, № 22. С. 44-52. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Mun S.A., Gordeeva L.A., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E., Vafin I.A. Personal immunological phenotype and breast cancer risk in postmenopausal women. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 22, pp. 44-52. (In Russ.)]
3. Гордеева Л.А., Глушкова О.А., Воронина Е.Н. Ассоциации материнских полиморфизмов генов цитокинов (*IL1B, IL1RN, TNF, IL4, IL6*) с врожденными пороками развития у плода и новорожденного // Иммунология, 2013. Т. 34, № 6. С. 298-304. [Gordeeva L.A., Glushkova O.A., Voronina E.N. Association of maternal polymorphisms of cytokine gene (*IL1B, IL1RN, TNF, IL4, IL6*) with congenital malformations in fetus and newborn. *Immunologiya = Immunology*, 2013, Vol. 34, no. 6, pp. 298-304. (In Russ.)]
4. Шевченко А.В., Голованова О.В., Коломейчук М.Ю., Коненков В.И., Гарбуков Е.Ю., Стахеева М.Н. Полиморфизм промоторного региона генов *IL-4, IL-6* и *IL-10* у пациенток с раком молочной железы // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 1. С. 21-28. [Shevchenko A.V., Golovanova O.V., Kolomejchuk M.Yu., Konenkov V.I., Garbukov E.Yu., Stakheeva M.N. Promotor polymorphism of *IL-4, IL-6*, and *IL-10* genes among patients with breast cancer. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 1, pp. 21-28. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-1-21-28.
5. Ambrosone C.B., Abrams S.M., Gorlewska-Roberts K., Kadlubar F.F. Hair dye use, meat intake, and tobacco exposure and presence of carcinogen-DNA adducts in exfoliated breast ductal epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, Vol. 464, no. 2, pp. 169-175.
6. Bourtourault M., Shacoori V., Guerin J., Saiag B., Rault B. Effects of simultaneous active immunization against 17 beta-estradiol and testosterone on pituitary and ovarian activity in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1991, Vol. 72, no. 3, pp. 273-284.
7. Caldwell B.V., Tillson S.A., Esber H., Thorneycroft I.H. Survival of tumors after immunization against oestrogens. *Nature*, 1971, Vol. 231, no. 5298, pp. 118-119.
8. Černohorská H., Klimešová S., Lepša L., Jinoch P., Milcová A., Schmuczerová J., Topinka J., Lábaj J. Influence of immunization with non-genotoxic PAH-KLH conjugates on the resistance of organisms exposed to benzo[a]pyrene. *Mut. Res.*, 2012, Vol. 742, no. 1-2, pp. 2-10.
9. Glushkov A., Polenok E., Kostyanko M., Antonov A., Verzhbitskaya N., Vafin I., Ragozhina S. Postmenopausal breast cancer risk in relation to antibodies specific to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone. *Iran J. Cancer Prev.*, 2016, Vol. 9, no. 2, e4212. doi: 10.17795/ijcp-4212.
10. Grova N., Prodhomme E.J., Schellenberger M.T., Farinelle S., Muller C.P. Modulation of carcinogen bioavailability by immunisation with benzo[a]pyrene – conjugate vaccines. *Vaccine*, 2009, Vol. 27, no. 31, pp. 4142-4151.
11. Hillier S.G., Groom G.V., Boyns A.R., Cameron E.H. Effects of active immunisation against steroids upon circulating hormone concentrations. *J. Steroid Biochem.*, 1975, Vol. 6, no. 3-4, pp. 529-535.
12. Li H.H., Zhu H., Liu L.S., Huang Y., Guo J., Li J., Sun X.P., Chang C.X., Wang Z.H., Zhai K. Tumour necrosis factor- α gene polymorphism is associated with metastasis in patients with triple negative breast cancer. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, e10244. doi: 10.1038/srep10244.
13. Peng X., Shi J., Sun W., Ruan X., Guo Y., Zhao L., Wang J., Li B. Genetic polymorphisms of *IL-6* promoter in cancer susceptibility and prognosis: a meta-analysis. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, no. 15, pp. 12351-12364.
14. Pruthi S., Yang L., Sandhu N.P., Ingle J.N., Beseler C.L., Suman V.J., Cavalieri E.L., Rogan E.G. Evaluation of serum estrogen-DNA adducts as potential biomarkers for breast cancer risk. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2012, Vol. 132, no. 1-2, pp. 73-79.
15. Sagiv S.K., Gaudet M.M., Eng S.M., Abrahamson P.E., Shantakumar S., Teitelbaum S.L., Bell P., Thomas J.A., Neugut A.I., Santella R.M., Gammon M.D. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and survival among women with breast cancer. *Environ. Res.*, 2009, Vol. 109, no. 3, pp. 287-291.

Авторы:

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

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

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

Воронина Е.Н. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

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

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

Брежнева Е.В. — ведущая маммологическим отделением ГБУЗ Кемеровской области «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия

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

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

Глушков А.А. — студент Института медицины и психологии В. Зельмана ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Authors:

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

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

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

Voronina E.N., PhD (Biology), Research Associate, Pharmacogenomics Laboratory, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

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

Lutsenko V.A., PhD (Medicine), Chief Physician, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Brezhneva E.V., Head, Mammology Department, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

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

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

Glushkov A.A., Student, V. Zelman Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 26.06.2019

Отправлена на доработку 13.09.2019

Принята к печати 03.12.2019

Received 26.06.2019

Revision received 13.09.2019

Accepted 03.12.2019

ФЕНОТИП БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ С «СИНДРОМОМ T-bet»

Сорокина Л.Н., Минеев В.Н., Еремеева А.В., Нёма М.А.

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

Резюме. Нашей целью была оценка значимости транскрипционного фактора T-bet при бронхиальной астме (БА). Всего обследовано 102 больных бронхиальной астмой (БА), контрольная группа была представлена практически здоровыми лицами (21 человек). В качестве модели исследования были выбраны мононуклеары периферической крови, выделенные на градиенте плотности с использованием стандартной методики выделения мононуклеаров. При оценке индивидуальных уровней экспрессии транскрипционного фактора T-bet было выявлено, что часть больных характеризовалась высокими значениями экспрессии исследуемого транскрипционного фактора (уровень экспрессии T-bet > 1,0). Больные БА с феноменом повышения уровня экспрессии T-bet характеризуются преимущественно тяжелым течением заболевания, нуждаются в терапии системными глюкокортикоидами и 2-агонистами, не имеют отягощенной наследственности по аллергическим заболеваниям, в подавляющем большинстве имеют избыточную массу тела и сопутствующую патологию, среди которой ведущее место занимают заболевания сердечно-сосудистой и эндокринной систем, а также патология желудочно-кишечного тракта. При исследовании полиморфизма rs324011 гена белка STAT6 у пациентов данной группы были выявлены генотипы CC и CT, характерные для фенотипов с преимущественно тяжелым течением БА. Причем у больных с тяжелым течением БА они наблюдались в 100% случаев. Выявлена положительная корреляционная связь между количеством аллеля T в локусах и тяжестью течения БА ($r = 0,88$; $p = 0,002$), а также между распределением по генотипу (CC-CT/TT) и абсолютным (л-1) и относительным (%) количеством эозинофилов в мокроте ($r = 0,79$; $p = 0,034$). Обнаруженный симптомокомплекс может быть назван как «синдром повышения T-bet», в основе которого лежит феномен «генетически детерминированной гетерогенности дефектов сигнальных систем». У лиц с повышенным уровнем экспрессии T-bet также было выявлено достоверное повышение уровней транскрипционных факторов STAT6 и STAT4. В совокупности представленные данные свидетельствуют о том, что выявленный нами феномен, вероятно, отражает нарушение Th1/Th2-баланса за счет повышения как Th1-, так и Th2-транскрипционной активности. Таким образом, у больных с бронхиальной астмой с повышенной экспрессией транскрипционного фактора T-bet выявлен симптомокомплекс, названный нами «синдром повышения T-bet» (уровень экспрессии T-bet > 1,0), который характеризуется преимущественно тяжелым течением заболевания и определенным фенотипом больных. Вероятнее всего, данная особенность вызвана генетически обусловленными дефектами сигнальных систем. Повышение экспрессии T-bet показано у молодых пациентов с легким течением и может являться прогностическим признаком.

Ключевые слова: бронхиальная астма, факторы транскрипции, T-bet, STAT4, STAT6, фенотип

Адрес для переписки:

Сорокина Лада Николаевна
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) 403-90-35.
E-mail: lada_sorokina@mail.ru

Address for correspondence:

Sorokina Lada N.
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg,
L. Tostoy str., 6-8.
Phone: 7 (921) 403-90-35.
E-mail: lada_sorokina@mail.ru

Образец цитирования:

Л.Н. Сорокина, В.Н. Минеев, А.В. Еремеева,
М.А. Нёма «Фенотип бронхиальной астмы
с «синдромом T-bet» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 1. С. 181-186.
doi: 10.15789/1563-0625-TSB-1874
© Сорокина Л.Н. и соавт., 2020

For citation:

L.N. Sorokina, V.N. Mineev, A.V. Eremeeva, M.A. Nyoma
“T-bet syndrome-associated bronchial asthma phenotype”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 1, pp. 181-186.
doi: 10.15789/1563-0625-TSB-1874
DOI: 10.15789/1563-0625-TSB-1874

T-bet SYNDROME-ASSOCIATED BRONCHIAL ASTHMA PHENOTYPE

Sorokina L.N., Mineev V.N., Ereemeeva A.V., Nyoma M.A.

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

Abstract. We aimed to evaluate a significance of T-bet transcription factor in bronchial asthma (BA). A total of 102 patients with BA were examined. The control group was represented by healthy subjects (21 people). The study model was represented by peripheral blood mononuclear cells isolated in a density gradient with standard method. It was found that some patients were characterized by high levels of transcription factor T-bet expression ($T\text{-bet} > 1.0$). The bronchial asthma patients with increased T-bet expression were often characterized by the severe disease, requiring therapy with systemic glucocorticoids and β_2 -agonists, did not have genetic predisposal for allergic diseases, the majority of them had excess body weight and concomitant morbidity (mainly, cardiovascular, gastrointestinal and endocrine disorders). The study of rs324011 polymorphism of STAT6 protein gene in these patients revealed CC and CT genotypes, mostly observed in severe BA. Moreover, they were observed in 100% patients with severe clinical course of BA. A positive correlation was found between the number of T allele presentation in loci, and BA severity ($r = 0.88$, $p = 0.002$), as well as between the distribution by genotype (CC-CT/TT), and absolute (counts per one L), and relative (%) number of eosinophils in the sputum ($r = 0.79$, $p = 0.034$). The detected associations may be referred to as “T-bet elevation syndrome”, being based on the phenomenon of “genetically determined heterogeneity of signaling system defects”. In individuals with an increased T-bet expression, a significant elevation of transcription factors STAT6 and STAT4 was also detected. Taken together, the presented data indicate that this phenomenon reflects a disturbance of the Th1 / Th2 balance, due to increase in both Th1 and Th2 transcriptional activity. Thus, the patients with bronchial asthma with increased expression of T-bet transcription factor revealed a symptom complex, which we have called “T-bet elevation syndrome” ($T\text{-bet} > 1.0$), which is characterized mainly by severe disease and a certain phenotype of patients. Most likely, this feature is caused by genetically determined defects of signaling systems. High T-bet expression has been observed in young patients with mild BA and can be a prognostic sign.

Keywords: bronchial asthma, transcription factors, T-bet, STAT4, STAT6, phenotype

Введение

В предыдущих работах нами [1] было показано, что уровень экспрессии транскрипционного фактора T-bet при аллергическом варианте бронхиальной астмы (АБА) обладал некоторыми особенностями: при утяжелении течения заболевания (вне связи с его фазой) эта величина уменьшалась в сравнении с группой практически здоровых.

Напомним, что фактор транскрипции T-bet (TBX21, T-box protein) принадлежит семейству TBX (T-box protein), представленному 18 белками [2]. T-bet играет роль ключевого фактора развития Th1- и Th1-связанной экспрессии $IFN\gamma$. Действие T-bet на Т-хелперы 2 типа и Т-хелперы 17 вело к превращению этих клеток в Th1-лимфоциты, которые синтезируют $IFN\gamma$ [3].

Также известно, что T-bet способен подавлять экспрессию GATA3, ключевого транскрипционного фактора Th2 [4]. Таким образом, с учетом имеющихся сейчас данных можно утверждать, что T-bet — один из главных факторов транскрипции, влияющих на патогенез и аллергического, и нервно-психического варианта бронхиальной астмы [5].

Наиболее сниженным уровнем экспрессии T-bet в мононуклеарах периферической крови характеризовалась группа пациентов с аллергическим вариантом БА: уровни T-bet в этой группе были ниже в 7 и 6 раз по сравнению со здоровыми лицами и больными неаллергическим вариантом БА соответственно. При этом между группами здоровых лиц и неаллергической БА не было значимых различий в уровнях T-bet [1].

Обнаруженное уменьшение уровней T-bet при аллергической БА — это, вероятно, следствие наследственно обусловленных дефектов при атопической конституции, ведущих к преобладанию Th2-опосредованного ответа и сохранению аллергического варианта воспаления при БА.

При оценке индивидуальных уровней экспрессии транскрипционного фактора T-bet было выявлено, что часть больных характеризовалась увеличенными уровнями экспрессии этого фактора транскрипции (значение экспрессии $T\text{-bet} > 1.0$). Это наблюдение — основа для дальнейшего внимательного исследования группы этих факторов. Нами были проанализированы основные характеристики данных больных.

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГРУППЫ БОЛЬНЫХ С ФЕНОМЕНОМ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА T-bet (n = 10)

TABLE 1. BASELINE CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH THE PHENOMENON OF INCREASED T-bet EXPRESSION (n = 10)

Показатель Parameter		n (%) больных в группе n (%)	Уровень значимости различий* P-value*
Наличие терапии системными глюкокортикоидами Glucocorticoid therapy	Да Yes	9 (90%)	p = 0,011
	Нет No	1 (10%)	
Тяжесть течения БА Asthma severity	сред. moderate	3 (30%)	p > 0,05
	тяж. severe	7 (70%)	
Наследственность отягощена по аллергическим заболеваниям Hereditary allergic diseases	Да Yes	1 (10%)	p = 0,011
	Нет No	9 (0,9%)	
Наличие сопутствующей патологии Comorbidities	Да Yes	10 (100%)	—
	Нет No	0 (0%)	
Наличие кардиологической патологии Cardiovascular comorbidity	Да Yes	7 (70%)	p > 0,05
	Нет No	3 (30%)	
Наличие гастроэнтерологической патологии Gastroenterologic comorbidity	Да Yes	10 (100%)	—
	Нет No	0 (0%)	
Наличие эндокринной патологии Endocrine comorbidity	Да Yes	5 (50%)	p > 0,05
	Нет No	5 (50%)	
Наличие избыточной массы тела Overweight	Да Yes	9 (90%)	p = 0,011
	Нет No	1 (10%)	
Наличие терапии на догоспитальном этапе Pre-hospital treatment	Да Yes	10 (100%)	—
	Нет No	0 (0%)	
Наличие терапии β2-агонистами на догоспитальном этапе Pre-hospital treatment with β2-agonists	Да Yes	9 (90%)	p = 0,011
	Нет No	1 (10%)	
Возраст больных БА (лет) Age (years)	41-60	9 (90%)	p = 0,011
	> 71	1 (10%)	

Примечание. * — критерий χ^2 для качественных признаков.

Note. *, χ^2 -test.

Материалы и методы

Всего обследовано 102 больных бронхиальной астмой (БА), контрольная группа была представлена практически здоровыми лицами (21 человек). В качестве модели исследования были выбраны мононуклеары периферической крови (сепарированные с помощью градиента плотности и классического метода выделения мононуклеарных клеток).

Исследование экспрессии белков (STAT6, STAT4, GATA3, T-bet) методом иммуноблоттинга в мононуклеарах периферической крови

Концентрацию белка вычисляли методом Брэдфорд (1976), применяя овальбумин для представления калибровочной кривой.

Иммуноблоттинг и электрофорез

Разделение белков производили диск-электрофорезным методом в ПААГ с наличием SDS в варианте Laemmli (1970). Для визуализации полос белка применялся краситель Ponceau S. Иммуноблоттинг выполняли методом ECL Western blotting protocols (Amersham). Хемилюминесцентное излучение фиксировалось на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция). Уровни экспрессии определяли по сравнению с уровнями β -актина.

Определение полиморфизма rs324011 гена белка STAT6

Для регистрации полиморфного варианта rs324011 гена STAT6 использовалась методика ПЦР с ДНК, полученной из лейкоцитов, рестрикцией и анализом длины и количества образовавшихся в результате рестрикции фрагментов цепи путем электрофореза в ПААГ. Олигонуклеотидные праймеры для участка интрона 2 гена STAT6 выбирались на основе известной последовательности 12 хромосомы AC018673 (GenBank). 216-нуклеотидный амплификат подвергался действию эндонуклеазы Ava II (Eco47I, Fermentas).

Анализ результатов проводился с применением программы SPSS для Windows (Statistical Package for the Social Science for Windows) (русифицированная версия 13.0). Вывод о значимости делался при уровне p не более 0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования отражены в таблице 1.

Приведенные в таблице 1 данные показывают, что больные БА с феноменом увеличенной экспрессии T-bet отличаются преимущественно БА тяжелого течения заболевания, нуждаются в лечении системными глюкокортикостероидами и β -адреноагонистами, у них нет отягощенной

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ STAT4 И STAT6 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА T-bet (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К β -АКТИНУ)

TABLE 2. STAT4 AND STAT6 EXPRESSION IN DEPENDENCE OF T-bet EXPRESSION (INTEGRATED DENSITY TO β -ACTIN)

Показатель Parameter	Уровень экспрессии T-bet T-bet expression	n	Среднее, стандартное отклонение Mean, standard deviation	Уровень значимости различий* P-value*
Уровень экспрессии STAT4 STAT4 expression	$\geq 1,0$	20	0,93 $\pm$ 0,70	$p = 0,0001$
	$< 1,0$	60	0,45 $\pm$ 0,41	
Уровень экспрессии STAT4 в условиях инкубации с IL-4 STAT4 expression under IL-4 incubation	$\geq 1,0$	20	1,07 $\pm$ 0,83	$p = 0,005$
	$< 1,0$	60	0,47 $\pm$ 0,42	
Уровень экспрессии STAT6 STAT6 expression	$\geq 1,0$	26	0,95 $\pm$ 0,87	$p = 0,023$
	$< 1,0$	76	0,60 $\pm$ 0,56	
Уровень экспрессии STAT6 в условиях инкубации с IL-4 STAT6 expression under IL-4 incubation	$\geq 1,0$	26	1,07 $\pm$ 0,83	$p = 0,003$
	$< 1,0$	76	0,50 $\pm$ 0,42	

Примечание. * – t-критерий Стьюдента.

Note. *, Student's t-test.

наследственности по болезням аллергического ряда, многие имеют избыточную массу тела и сопутствующие заболевания, ведущую роль среди которых играют патологии эндокринной и сердечно-сосудистой систем, а также болезни пищеварительной системы.

Отметим также, что при анализе полиморфизма rs324011 гена фактора STAT6 у пациентов с феноменом повышенной экспрессии T-bet были обнаружены комбинации аллельных вариантов СС и СТ, характерные для больных бронхиальной астмой преимущественно тяжелого течения. При этом в группе больных именно с тяжелым течением БА они определялись у 100%. Для оценки влияния генотипа на клинические проявления заболевания нами был проведен корреляционный анализ, по результатам которого была выявлена положительная связь количества аллеля Т в локусах и тяжести течения бронхиальной астмы ($r = 0,88$; $p = 0,002$), а также между распределением по генотипу (СС-СТ/ТТ) и абсолютным ($л^{-1}$) и относительным (%) количеством эозинофилов в мокроте ($r = 0,79$; $p = 0,034$). Выявленный, таким образом, симптомокомплекс может быть определен как «синдром повышения T-bet», в основе которого лежит феномен «наследственно запрограммированной разнородности дефектов сигнальных систем».

Отметим, что обнаружение данного феномена весьма важно, так как выраженное увеличение экспрессии T-bet было выявлено не только у больных, но и у некоторых здоровых лиц, которые в момент наблюдения не страдают никакими заболеваниями (ни аллергическими, ни неаллергическими) ($n = 6$).

Обратим внимание на то, что в генотипах пациентов этой группы (обозначенной как «скрытый синдром повышения T-bet») с довольно высокой частотой встречается цитозинный аллель (С) (доля участников исследования с аллелем С = 81,3; $n = 16$; $p = 0,012$). Поэтому весьма актуальным видится наблюдение подобных лиц в динамике для определения вероятности развития у них в будущем проявлений обнаруженного нами синдрома.

Также заметим, что у лиц с повышением экспрессии T-bet было выявлено значимое увеличение уровней факторов транскрипции STAT6 и STAT4, являющихся компонентами Th2- и Th1-внутриклеточных систем сигнализации соответственно (табл. 2).

В совокупности представленные факты указывают на то, что выявленный нами феномен, вероятно, отражает нарушение Th1/Th2-баланса за счет повышения как Th1-, так и Th2-транскрипционной активности.

Таким образом, у больных с бронхиальной астмой с повышенной экспрессией транскрипционного фактора T-bet выявлен симптомокомплекс, названный нами «синдром повышения T-bet» (уровень экспрессии T-bet $> 1,0$), который характеризуется преимущественно тяжелым течением БА и определенным фенотипом больных. Вероятнее всего, данная особенность вызвана генетически обусловленными дефектами сигнальных систем. Важно подчеркнуть, что значительное повышение экспрессии T-bet также показано у молодых пациентов с легким течением и может являться прогностическим признаком дальнейшего развития заболевания.

Список литературы / References

1. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н. Экспрессия транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови при бронхиальной астме // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 1-2. С. 169-173. [Mineev V.N., Sorokina L.N. Expression of T-bet factor in peripheral blood cells in bronchial asthma. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 1-2, pp. 169-173. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-1-2-169-173.
2. Ko F.W., Lun S.W., Wong C.K., Szeto C.C., Lam C.W., Leung T.F., Hui D.S. Decreased T-bet expression and changes in chemokine levels in adults with asthma. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 147, no. 3, pp. 526-532.
3. Lazarevic V., Chen X., Shim J.H., Hwang E.S., Jang E., Bolm A.N., Oukka M., Kuchroo V.K., Glimcher L.H. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 1, pp. 96-104.
4. Usui T., Preiss J.C., Kanno Y., Yao Z.J., Bream J.H., O'Shea J.J., Strober W.J. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, no. 3, pp. 755-766.
5. Wilson V., Conlon F.L. The T-box family. *Genome Biol.*, 2002, Vol. 3, no. 6, reviews3008. doi: 10.1186/gb-2002-3-6-reviews3008.
6. Zhu M., Liang Z., Wang T., Chen R., Wang G., Ji Y. Th1/Th2/Th17 cells imbalance in patients with asthma with and without psychological symptoms. *Allergy Asthma Proc.*, 2016, Vol. 37, no. 2, pp. 148-156.

Авторы:

Сорокина Л.Н. — д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Минеев В.Н. — д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Еремеева А.В. — к.м.н., старший лаборант кафедры госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Нёма М.А. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Поступила 08.10.2019
Отправлена на доработку 20.11.2019
Принята к печати 03.12.2019

Authors:

Sorokina L.N., PhD, MD (Medicine), Professor, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department with a Course of Allergology and Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Mineev V.N., PhD, MD (Medicine), Professor, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department with a Course of Allergology and Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Eremeeva A.V., PhD (Medicine), Senior Laboratory Assistant, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department with a Course of Allergology and Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Nyoma M.A., PhD (Medicine), Associate Professor, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department with a Course of Allergology and Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Received 08.10.2019
Revision received 20.11.2019
Accepted 03.12.2019

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К МОРФИН- СПЕЦИФИЧЕСКИМ ИММУНОГЛОБУЛИНАМ

Трофимов А.В.¹, Атанесян В.А.¹, Ищенко А.М.¹, Карабанова Е.А.¹,
Рак А.Я.^{1,2}, Симбирцев А.С.¹, Гамалея Н.Б.³, Берзина А.Г.³,
Станкова Н.В.⁴, Капанадзе Г.Д.⁴, Ульянова Л.И.³, Климова Т.А.³

¹ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, п. Светлые горы, Красногорский район, Московская обл., Россия

Резюме. Получение и изучение антиидиотипических (вторичных) антител (Ab2) к моноклональным первичным антителам (Ab1), специфичным к биологически активным молекулам с известной структурой, имеет большую научную и практическую значимость. В связи с частичным антигенным подобием структур Ab2 и исходного антигена эти антитела могут стать основой вакцины в том случае, если использование антигена невозможно или ограничено законодательством. В частности, на основе Ab2 могут быть созданы препараты, предназначенные для иммунизации с целью профилактики и лечения наркологической зависимости. Ценность свойств Ab2 еще более возрастает, если для их получения используют Ab1, распознающие разные участки молекулы антигена, что позволяет получить антитела второго поколения с широким спектром специфичности. В данной работе были получены морфиноподобные поликлональные и моноклональные Ab2. В каждом случае в качестве иммуноглобулинов первого поколения для иммунизации мы использовали два мышинных моноклональных антитела (mAb), специфичных к различным производным морфина: антитела 3K11 — к 3-0-карбоксиметильному (КММ) и 2-р-карбокси-фенилазометильному (ФАМ) производным, а также антитела 6G1 — к 6-гемисукцинильному производному (ГСМ). После проведения иммунизации лошади данными Ab1 и развития иммунного ответа из сыворотки крови животного были выделены три пула специфических поликлональных антител — антивидовые антитела лошади к тотальным иммуноглобулинам мыши (НАМ), антиидиотипические антитела лошади к антителам 3K11 (НАМ-K11) и к антителам 6G1 (НАМ-G1). Параллельно в результате иммунизации мышей антителами 3K11 и 6G1 и проведения слияния лимфоцитов животных с клетками миеломы мыши линии Sp2/0 по методу Мильштейна—Кёлера были получены три продуцента антиидиотипических антител: клон, продуци-

Адрес для переписки:

Трофимов Александр Викторович
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
ФМБА России
197110, Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7.
Тел.: 8 (904) 632-07-27.
E-mail: a.v.trofimov@hpb.spb.ru

Address for correspondence:

Trofimov Alexander V.
State Research Institute of Highly Pure Biopreparations,
Federal Medical-Biological Agency
197110, Russian Federation, St. Petersburg,
Pudozhskaya str., 7.
Phone: 7 (904) 632-07-27.
E-mail: a.v.trofimov@hpb.spb.ru

Образец цитирования:

А.В. Трофимов, В.А. Атанесян, А.М. Ищенко,
Е.А. Карабанова, А.Я. Рак, А.С. Симбирцев,
Н.Б. Гамалея, А.Г. Берзина, Н.В. Станкова,
Г.Д. Капанадзе, Л.И. Ульянова, Т.А. Климова
«Получение поликлональных и моноклональных
антиидиотипических антител к морфин-
специфическим иммуноглобулинам» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 187–196.
doi: 10.15789/1563-0625-POP-1658

© Трофимов А.В. и соавт., 2020

For citation:

A.V. Trofimov, V.A. Atanesyan, A.M. Ischenko,
E.A. Karabanova, A.Ya. Rak, A.S. Simbirtsev,
N.B. Gamaleya, A.G. Berzina, N.V. Stankova,
G.D. Kapanadze, L.I. Ulyanova, T.A. Klimova
“Preparation of polyclonal and monoclonal anti-idiotypic antibodies against
morphine-specific immunoglobulins”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 1,
pp. 187–196.
doi: 10.15789/1563-0625-POP-1658

DOI: 10.15789/1563-0625-POP-1658

рующий мышинные моноклональные Ab2, специфичные к мАт-6G1 (АИ-6G1), а также клоны, продуцирующие анти-мАт-3K11 антитела (АИ-К11А и АИ-К11В). В исследовании охарактеризованы физико-химические и антигенные свойства всех полученных Ab2. Показано, что антиидиотипические иммуноглобулины лошади не только относятся к различным классам, но и являются поливалентными по специфичности, в то время как все полученные моноклональные Ab2 представлены иммуноглобулинами класса IgM и строго специфичны к соответствующим антителам первого поколения. В дальнейшем на клеточной модели будут исследованы морфиноподобные свойства полученных в работе первых отечественных поликлональных и моноклональных Ab2, а также изучена возможность индукции ими появления антител третьего поколения, как и Ab1, специфичных к морфину.

Ключевые слова: антиидиотипические антитела, антитела, иммуноферментный анализ, конкурентный анализ, моноклональные антитела, поликлональные антитела, производные морфина

PREPARATION OF POLYCLONAL AND MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES AGAINST MORPHINE-SPECIFIC IMMUNOGLOBULINS

**Trofimov A.V.^a, Atanesyan V.A.^a, Ischenko A.M.^a, Karabanova E.A.^a,
Rak A.Ya.^{a,b}, Simbirtsev A.S.^a, Gamaleya N.B.^c, Berzina A.G.^c,
Stankova N.V.^d, Kapanadze G.D.^d, Ulyanova L.I.^c, Klimova T.A.^c**

^a State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

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

^c V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

^d National Center of Biomedical Technologies, Federal Medical-Biological Agency, Svetlye gory, Moscow Region, Russian Federation

Abstract. The preparation and study of anti-idiotypic (secondary) antibodies (Ab2) against monoclonal primary antibodies (Ab1) specific to biologically active molecules with a known structure is of great scientific and practical importance. Due to partial antigenic similarity of Ab2 and the initial antigen structures, these antibodies can be the basis of the vaccine, if the antigen usage is not possible, or is limited by law. In particular, one may create Ab2-based preparations, designed for immunization, in order to prevent and treat the drug addiction. The value of Ab2 properties increases even more if Ab1, used to obtain them, recognize different parts of the antigen molecule, which makes it possible to obtain second-generation antibodies with a wide range of specificity. In this work, the morphine-like polyclonal and monoclonal Ab2 were obtained. In each case, as the first-generation immunoglobulins for immunization, we used two murine monoclonal antibodies (mAbs) specific to different morphine derivatives: 3K11 antibodies to 3-0-carboxymethyl (CMM) and 2-p-carboxyphenylazomethyl (FAM) derivatives, as well as 6G1 antibodies to 6-hemisuccinyl derivative (GSM). After immunization of the horse with Ab1 and development of immune response, three pools of specific polyclonal antibodies were isolated from the animal blood serum: horse anti-species antibodies to the total mouse immunoglobulins (HAM); horse anti-idiotypic antibodies against 3K11 antibodies (HAM-K11), and against 6G1 antibodies (HAM-G1). In parallel, immunization of mice with 3K11 and 6G1 antibodies and fusion of obtained lymphocytes with Sp2/0 mouse myeloma cells by the Milstein-Köhler method resulted in three producers of anti-idiotypic antibodies: a clone producing mouse monoclonal Ab2 specific for mAb-6G1 (AI-6G1), as well as clones producing anti-mAb-3K11 antibodies (AI-K11A and AI-K11B). The physico-chemical and antigenic properties of all the Ab2 obtained were characterized. It was shown that the horse anti-idiotypic immunoglobulins not only belong to different classes, but are also polyvalent, while all monoclonal Ab2 obtained are represented by IgM immunoglobulins, being also strictly specific to the corresponding first-generation antibodies. Subsequently, the morphine-like properties of the first domestic polyclonal and monoclonal Ab2 obtained in the work will be investigated in a cellular model. Likewise, we shall study their ability to induce Ab3 as well as morphine-specific Ab1.

Keywords: anti-idiotypic antibodies, antibodies, competitive analysis, ELISA, monoclonal antibodies, morphine derivatives, polyclonal antibodies

Введение

Антиидиотипические (вторичные) антитела (Ab2) являются иммуноглобулинами, вырабатываемыми на идиотип, то есть на антигенные детерминанты активных центров первичного антитела (Ab1) к определенному антигену (Ag) [5]. По своим свойствам они подразделяются на три типа: Ab2 α , Ab2 β и Ab2 γ . Ab2 α взаимодействуют с Ab1, но не блокируют взаимодействие Ab1 с Ag. Антитела Ab2 β несут на себе образ антигена, распознают паратоп или отдельный участок центра связывания Ab1 и при иммунизации вызывают образование антител следующего поколения (Ab3), которые, подобно Ab1, способны распознавать Ag. Наконец, антитела Ab2 γ способны к взаимодействию с активным центром Ab1 и блокируют связывание Ab1 с Ag, но при иммунизации не вызывают образования антител, специфичных к антигену (Ab3). Наибольшую научную и практическую значимость имеют антитела Ab2 β , обладающие уникальными иммунологическими свойствами, в частности способностью индуцировать выработку антител к наркотикам (кокаину и производным морфина) [3, 6, 10].

В то время как поликлональные Ab2-антитела представлены сразу тремя подтипами антиидиотипических антител, моноклональные антитела, являясь по своей природе моноспецифическими, относятся только к одному подтипу. Поэтому сравнительная характеристика влияния различных типов Ab2 на иммунный ответ организма позволяет определить их возможную роль для лечения и профилактики наркотической зависимости.

Целью данного исследования было получение и изучение свойств антиидиотипических поликлональных и моноклональных антител к полученным ранее моноклональным антителам: 3K11,

распознающему 3-0-карбоксиметильное (КММ) и 2-р-карбокси-фенилазометильное (ФАМ) производные морфина, и 6G1, распознающему 6-гемисукцинильное производное (ГСМ) [1].

Материалы и методы

Лабораторные животные и материалы

Работа выполнена с использованием мышей линии Balb/c (ФГУП «Питомник лабораторных животных Рапполово») и лошади (кобыла породы рысистая, 9 лет, вес 500 кг), которая была предоставлена ФГБНУ ФИЦВиМ (пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская обл.).

Мышиные моноклональные антитела 3K11 и 6G1 были получены по схеме, описанной ранее в работе [1]. Конъюгаты моноклональных и поликлональных антител с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Германия) получали по методике [8].

В работе использовались производные морфина: 6-гемисукцинильное (ГСМ), 2-р-карбокси-фенилазометильное (ФАМ) и 3-0-карбоксиметильный эфир (КММ), конъюгированные с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и лизоцимом с помощью бифункционального реагента — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлорид. Данные конъюгаты были получены ранее по методикам, описанным в статьях [2, 3].

Получение поликлональных антиидиотипических антител лошади (НАМ-K11 и НАМ-G1)

Поликлональные антиидиотипические антитела Ab2 (НАМ-K11 и НАМ-G1) были выделены из гипериммунной сыворотки крови лошади. Схема иммунизации лошади моноклональными мышиными антителами mAt-3K11 и mAt-6G1, специфичными к антигенам — производным морфина — КММ-БСА и ГСМ-БСА соответственно, представлена в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. СХЕМА ИММУНИЗАЦИИ ЛОШАДИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ Ab2

TABLE 1. SCHEDULE OF HORSE IMMUNIZATION TO OBTAIN ANTI-IDIOTYPIC Ab2 ANTIBODIES

Вводимый антиген Administered antigen	Способ введения антигена Antigen administration method	
	1-я инъекция – 0 день 1 st injection – day 0	2-я инъекция – 14-й день 2 nd injection – day 14
МАТ 3K11 МАТ 6G1 mAbs 3K11 mAbs 6G1	10 мг антигена в 2 точки в области крупа с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ), в соотношении 1:1 по объему внутримышечно 10 mg of antigen at 2 points in the croup region with Freund's complete adjuvant (FCA), in a ratio of 1:1 by volume intramuscularly	10 мг антигена в 2 точки верхней части шеи с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ), 1:1 подкожно 10 mg of antigen in 2 points of the neck upper part with incomplete Freund's adjuvant (IFA), 1:1 subcutaneously
	3-я инъекция – 75-й день 3 rd injection – day 75	4-я инъекция – 100-й день 4 th injection – day 100
	2 мг антигена в 2 точки в области крупа с НАФ (1:1) внутримышечно 2 mg of antigen at 2 points in the croup region with FCA (1:1) intramuscularly	2 мг антигена в 2 мл физиологического раствора внутривенно 2 mg of antigen in 2 ml of saline intravenously

Ab2-антитела выделяли с помощью аффинной хроматографии на иммуносорбенте, приготовленном на основе циан-бром-активированной сефарозы 4В (Sigma-Aldrich) по модифицированной методике [4]. В качестве лиганда использовали тотальные иммуноглобулины (Ig) мыши класса G, моноклональные антитела 3K11 или 6G1.

На первом этапе выделения Ab2-антител сыровотку лошади истожали от антивидовых антител. Для этого лошадиную сыровотку пропускали через сорбент с иммобилизованными IgG мыши, уравновешенный 20 мМ фосфатно-солевым буфером, pH 7,4 (ФСБ). После нанесения образца колонку промывали пятью объемами уравновешивающего буфера. Далее для удаления неспецифически связавшихся белков через колонку пропускали один объем ФСБ, содержащего 1 М NaCl, после чего вновь уравновешивали колонку ФСБ и проводили элюцию раствором 0,1 М глицина, pH 2,5, при скорости потока 1 мл/мин. В ходе хроматографии пики детектировали при длине волны 280 нм. Полученный элюат нейтрализовали до pH 7,2-7,4. Концентрацию белка в элюате измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм с учетом коэффициента молярной экстинкции 1,4.

По результатам ИФА, когда остаточный титр антивидовых антител НАМ составлял не более 0,1% от исходного, истощенную сыровотку наносили последовательно на сорбенты с иммобилизованными мАт 3K11 и мАт 6G1. Выделение антиидиотипических антител НАМ-K11 и НАМ-G1 методом аффинной хроматографии проводили по той же схеме, что и при выделении антивидовых антител НАМ.

Получение моноклональных антиидиотипических антител

Мышей линии Balb/c иммунизировали конъюгатами гемоцианина лимфы улитки, конъюгированными с моноклональными антителами 3K11 и 6G1, приготовленными по ранее описанной методике [8]. Для этого эмульгированный в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ) антиген в дозе 10 мкг на мышь вводили в подошвенный апопневроз задних конечностей. На 30-й день после иммунизации животным вводили внутривенно 5 мкг мАт 3K11 или 6G1 в физиологическом растворе. На 4-й день после инъекции животных умерщвляли цервикальной дислокацией и выделяли спленоциты и лимфоциты паховых и брюшных лимфоузлов. Полученные клетки смешивали с клетками миеломы мыши линии SP 2/0 в соотношении 2:1. Гибридизацию клеток проводили 50% раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 1500 дальтон в течение 1,5 мин с последующим 4-кратным добавлением через 1 мин среды RPMI-1640 в объеме, равном объему раствора ПЭГ. После слияния клетки дважды отмывали культуральной средой и высевали

в 96-луночные культуральные планшеты с суточными перитонеальными макрофагами (5×10^3 клеток на лунку) из расчета 5×10^4 клеток на лунку по миеломе. Селекцию гибридов проводили в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma, США), содержащей: 10^{-4} М гипоксантина, 4×10^{-7} М аминоптерина и $1,6 \times 10^{-5}$ М тимидина [9]. Полученные антиидиотипические моноклональные антитела были обозначены как АИ-K11А, АИ-K11Б и АИ-G1.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Первичный отбор позитивных клонов проводили по связыванию секретируемых антител с мАт 3K11 или 6G1. Для этого в лунки полистирольных планшетов Corning (Sigma, США) в посадочном буфере (20 мМ боратный буфер, pH 8,0, содержащий 0,15 М NaCl) адсорбировали мАт K-11 или 6G1 с концентрацией 1,5 мкг/мл в течение 20 часов во влажной камере при комнатной температуре. По окончании сорбции планшеты отмывали промывочным буфером (посадочный буфер, содержащий 0,05% Tween-20). В лунки вносили 100 мкл промывочного буфера, содержащего 10% мышиную сыровотку, и 50 мкл культуральной среды. Планшеты инкубировали 1 час при перемешивании при 37 °С. Затем в промытый планшет вносили раствор конъюгатов 3K11-пероксидаза или 6G1-пероксидаза в концентрации 100 нг/мл. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при перемешивании при 37 °С, после чего тщательно отмывали и проводили окрашивание с помощью раствора субстрата тетраметилбензидина (ХЕМА, Россия).

Культуральная среда клонов, показавшая специфическое связывание, повторно проверялась в конкурентном анализе по отмене связывания конъюгатов 3K11-пероксидаза или 6G1-пероксидаза с антигенами КММ-БСА или ГСМ-БСА, соответственно, в присутствии культуральной среды позитивных клонов. Для этого в лунки планшетов для ИФА сорбировали антигены в концентрации 5 мкг/мл. После отмывки в ячейки вносили по 50 мкл культуральной среды позитивных клонов и 50 мкл растворов конъюгатов 3K11-пероксидаза или 6G1-пероксидаза в концентрации 100 нг/мл. По отмене связывания конъюгатов с антигеном судили об антиидиотипической специфичности отобранных клонов.

Аналогичные схемы ИФА применялись для определения специфичности выделенных поликлональных и моноклональных Ab2-антител. Определение изотипа мАт проводили с помощью набора kit ISO-2 (Sigma-Aldrich) по методике производителя.

Позитивные клоны реклонировали для отбора стабильных продуцентов и криоконсервировали.

Моноклональные антитела отобранных позитивных клонов нарабатывали в перитонеальной полости сингенных мышей (BALB/C). Для это-

го внутривенно вводили $2-3 \times 10^6$ клеток на мыш. На 14-20-й день мышей умерщвляли цервикальной дислокацией и отбирали асцитную жидкость, из которой выделяли мАт с помощью аффинной хроматографии на сорбентах 3К11-сефароза или 6Г1-сефароза.

Электрофорез

Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле осуществляли по ранее описанной методике [11]. В работе использовался разделяющий гель с градиентной концентрацией акриламида 4-20% и концентрирующий гель с концентрацией акриламида 5%. Результаты электрофореза визуализировали с помощью стандартного окрашивания раствором Кумасси G-250.

Иммуноблоттинг

В ряде случаев анализ результатов электрофоретического разделения проводили с помощью вестерн-блоттинга по стандартному протоколу [7]. Для переноса белков использовали буферный раствор, содержащий 47,9 мМ Трис-НСl, 38,6 мМ глицина и 20% метанола, и нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,45 мкм. Перенос проводили в течение 1 часа при силе тока 350 мА, после чего мембрану инкубировали в блокирующем растворе (2% БСА в ФБ) в течение ночи при +4 °С. Затем вносили раствор первичных антител, поликлональных или моноклональных в концентрации 5 мкг/мл в блокирующем растворе. После часовой инкубации и двукратной отмывки мембрану также в течение часа обрабатывали раствором антивидового пероксидазного конъюгата антител козы против иммуноглобулинов мыши или лошади (Sigma, США) с концентрацией 0,5 мкг/мл. Для проявления окрашивания использовали 0,05% раствор диаминобензидина (Sigma, США) в ФБ, содержащий 1% диметилсульфоксида (Sigma, США) и 1% перекиси водорода (НеваРеактив, Россия).

Результаты

На рисунке 1 представлена схема фракционирования лошадиной сыворотки.

На первом этапе выделения Ab2-антител проводили истощение сыворотки от антивидовых антител лошади к иммуноглобулинам мыши. Для этого сыворотку трижды пропускали через сорбент IgG-мыши-сефароза, содержание специфических антител контролировали на каждом этапе ИФА. После того, когда содержание элюированных антивидовых антител составило менее 0,1% от суммарного, образец истощенной сыворотки последовательно пропускали через сорбенты 3К11-сефароза и 6Г1-сефароза.

В таблице 2 представлены концентрации поликлональных антивидовых НАМ и антиидиотипических антител НАМ-К11 и НАМ-Г1, вы-

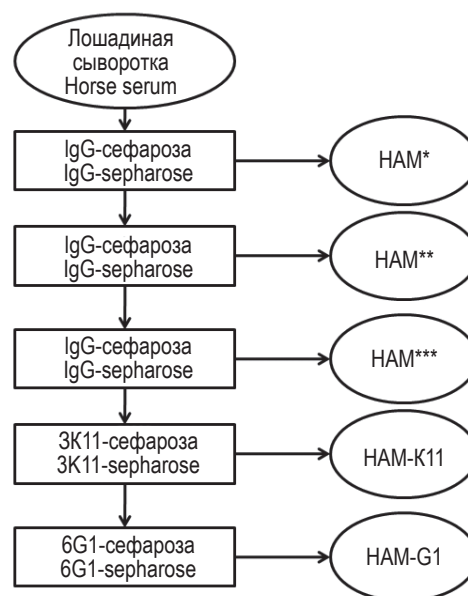


Рисунок 1. Схема выделения антивидовых и антиидиотипических поликлональных антител из сыворотки лошади

Примечание. Антивидовые антитела HAM*, HAM**, HAM*** – первая, вторая и третья стадии выделения; антиидиотипические антитела HAM-K11 и HAM-G1.

Figure 1. Scheme for the isolation of anti-species and anti-idiotypic polyclonal antibodies from horse serum

Note. Anti-species antibodies HAM*, HAM**, HAM***, the first, second and third stages of isolation; anti-idiotypic antibodies HAM-K11 and HAM-G1.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИВИДОВЫХ АНТИТЕЛ НАМ И АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ НАМ-К11 И НАМ-Г1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЛОШАДИ

TABLE 2. CONTENT OF POLYCLONAL ANTI-SPECIES HAM ANTIBODIES AND ANTI-IDIOTYPIC HAM-K11 AND HAM-G1 ANTIBODIES IN A HORSE SERUM

Антитела Antibodies	мг mg	%
HAM*	192	77,73
HAM**	37	14,98
HAM***	0,4	0,16
HAM-K11	6,78	2,74
HAM-G1	10,8	4,37

Примечание. HAM* – первая стадия истощения, HAM** – вторая стадия истощения, HAM*** – третья стадия истощения.

Note. HAM*, the first stage of absorption; HAM**, the second stage of absorption; HAM***, the third stage of absorption.

деленных из 100 мл сыворотки лошади на всех этапах истощения, и их процентный состав.

Для определения специфичности выделенных антител в планшеты с сорбированными IgG мыши, мАт 3К11 или мАт 6Г1 вносили се-

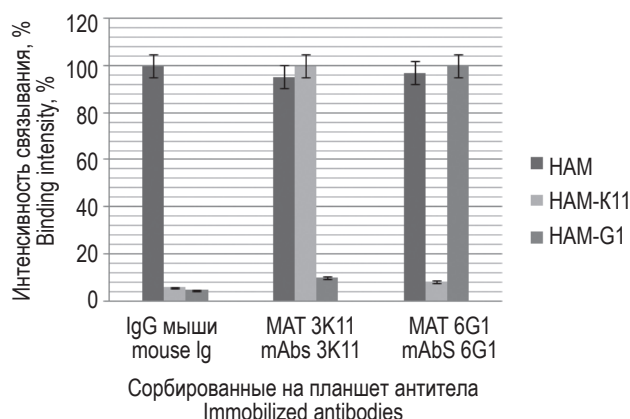
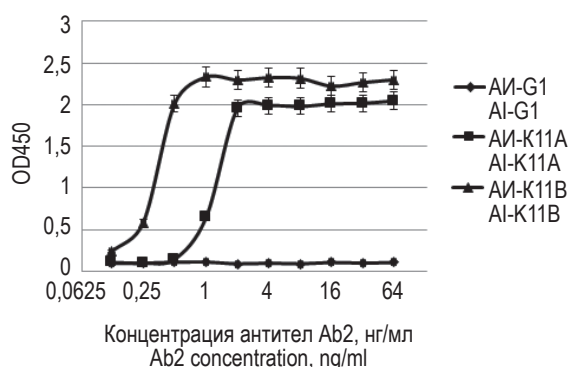


Рисунок 2. Сравнительная характеристика специфичности поликлональных антител HAM, HAM-K11 и HAM-G1

Figure 2. Comparative characteristics of the polyclonal antibodies HAM, HAM-K11 and HAM-G1 specificity

А (A)



Б (B)

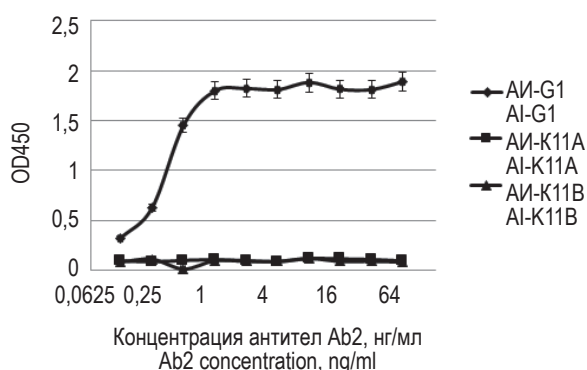


Рисунок 3. Определение специфичности моноклональных Ab2-антител AI-G1, AI-K11A и AI-K11B

Примечание. А – анализ в планшете с сорбированными МАТ 3K11 и конъюгатом 3K11-пероксидаза. Б – анализ в планшете с сорбированными МАТ 6G1 и конъюгатом 6G1-пероксидаза.

Figure 3. Determination of the specificity of monoclonal Ab2 antibodies AI-G1, AI-K11A and AI-K11B

Note. A, analysis in a plate with immobilized mAb-3K11 and conjugate 3K11-peroxidase. B, analysis in a plate with immobilized mAbs-6G1 and conjugate 6G1-peroxidase.

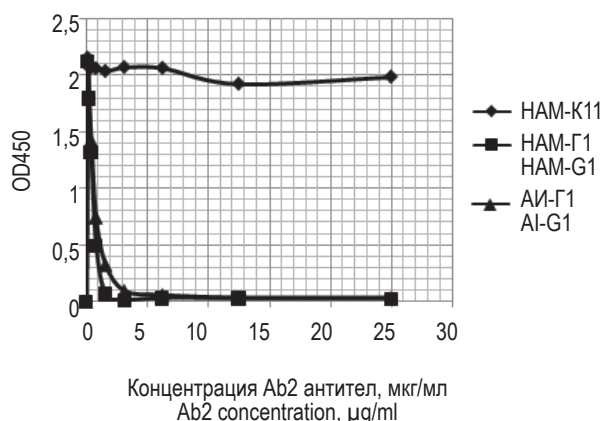


Рисунок 4. Конкурентный анализ Ab2-антител на сорбированном производном морфина GSM-BSA

Figure 4. Competitive analysis of Ab2 antibodies using the immobilized GSM-BSA morphine derivative

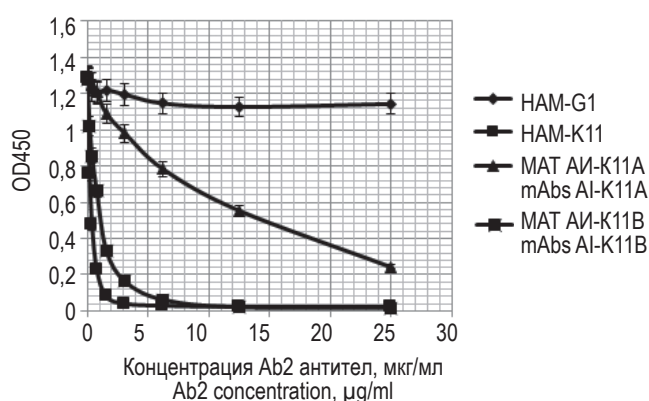


Рисунок 5. Конкурентный анализ Ab2-антител на сорбированном производном морфина KMM-BSA

Figure 5. Competitive analysis of Ab2 antibodies using the immobilized KMM-BSA morphine derivative

рии двукратных разбавлений HAM, HAM-K11 и HAM-G1. На последней стадии анализа планшеты инкубировали с антивидовым пероксидазным конъюгатом. По результатам ИФА для всех антител была построена калибровочная кривая зависимости оптической плотности при длине волны 450 нм от их концентрации. С их помощью были определены концентрации, при которых наблюдалось 50% связывание антител при условии, что препарат с минимальной концентрацией иммуноглобулина обладает 100% специфичностью. По соотношению минимальной концентрации иммуноглобулина и концентрации антител в исследуемых препаратах в точке, соответствующей 50% интенсивности связывания, рассчитывали процент специфичности. На рисунке 2 представлены полученные результаты.

Определение изотипа мышиных моноклональных Ab2-антител отобранных клонов показало, что все они являются иммуноглобулинами класса IgM.

Определение специфичности антиидиотипических моноклональных антител проводили в планшетах с сорбированными мАт 3К11 или 6Г1. В ячейки вносили приготовленные концентрационные разбавления Ab2-антител: АИ-Г1, АИ-К11А и АИ-К11В. После инкубации в лунки вносили раствор конъюгата пероксидазы с антителами, аналогичными тем, что сорбированы в планшете. На рисунке 3 представлены данные по определению специфичности полученных антител.

Для определения антиидиотипической специфичности полученных поликлональных и моноклональных Ab2-антител был проведен конкурентный ИФА. В планшете сорбировали производные морфина ГСМ-БСА или КММ-БСА в концентрации 5 мкг/мл. На следующей стадии вносили пробы с разными концентрациями исследуемых антител в промывочном буфере, содержащем 10% мышиной сыворотки и 100 нг/мл конъюгата 6Г1-пероксидазы или 3К11-пероксидазы соответственно. На рисунках 4 и 5 представлены результаты анализа в планшетах с сорбированными конъюгатами ГСМ-БСА и КММ-БСА соответственно.

В таблице 3 приведены молярные соотношения взаимодействия поликлональных и моноклональных Ab2-антител с конъюгатами 3К11-пероксидазы и 6Г1-пероксидазы, при которых наблюдается 50% подавление связывания конъюгатов с антигенами КММ-БСА и ГСМ-БСА соответственно.

На рисунке 6 представлены электрофореграммы аффинно выделенных поликлональных антимышиных НАМ и Ab2 НАМ-К11 и НАМ-Г1 антител.

ТАБЛИЦА 3. МОЛЯРНОЕ СООТНОШЕНИЕ Ab2-АНТИТЕЛ ПРИ 50% ПОДАВЛЕНИИ СВЯЗЫВАНИЯ КОНЪЮГАТОВ К11-Пх И Г1-Пх С ПРОИЗВОДНЫМИ МОРФИНА

TABLE 3. MOLAR RATIO OF Ab2 ANTIBODIES FOR 50% INHIBITION OF THE BINDING OF K11-Px AND G1-Px CONJUGATES TO MORPHINE DERIVATIVES

Конкуратор Competitor	3К11-Пх 3K11-Px	6Г1-Пх 6G1-Px
НАМ	—	—
НАМ-К11	1,35	—
НАМ-Г1	—	1,25
АИ-Г1А AI-G1A	—	1,46
АИ-К11А AI-K11A	50,01	—
АИ-К11В AI-K11B	4,09	—

Примечание. Подавления не наблюдается.

Note. Inhibition is not observed.

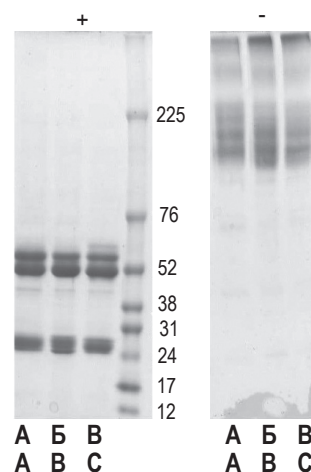


Рисунок 6. Электрофореграммы поликлональных антител НАМ, НАМ-К11 и НАМ-Г1 (нагрузка белка 5 мкг на дорожку градиентного денатурирующего геля)

Примечание. Поликлональные антитела лошади: А – антимышиные антитела НАМ; Б – антиидиотипические антитела НАМ-К11; В – антиидиотипические антитела НАМ-Г1; «+» – восстанавливающие и «-» – невосстанавливающие условия.

Figure 6. Electrophoregrams of polyclonal antibodies HAM, HAM-K11 and HAM-G1 (protein loading 5 µg per track of denaturing gradient gel)

Note. Horse polyclonal antibodies: A, HAM anti-mouse antibodies; B, anti-idiotypic antibodies HAM-K11; C, anti-idiotypic antibodies HAM-G1; “+”, reducing and “-”, non-reducing conditions.

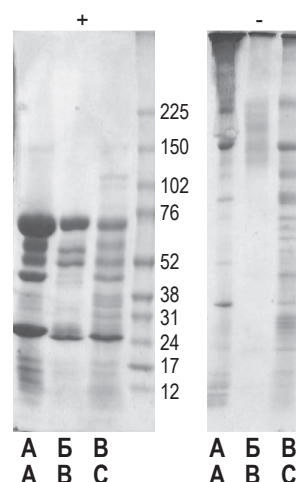


Рисунок 7. Электрофореграммы моноклональных антител АИ-Г1, АИ-К11А и АИ-К11В (нагрузка белка 5 мкг на дорожку градиентного денатурирующего геля)

Примечание. Моноклональные антиидиотипические антитела мыши: А – АИ-Г1; Б – АИ-К11А; В – АИ-К11В; «+» – восстанавливающие и «-» – невосстанавливающие условия

Figure 7. Electrophoregrams of monoclonal antibodies AI-G1, AI-K11A and AI-K11B (protein loading 5 µg per track of denaturing gradient gel)

Note. Mouse monoclonal anti-idiotypic antibodies: A, AI-G1; B, AI-K11A; C, AI-K11B; “+” reducing and “-”, non-reducing conditions.

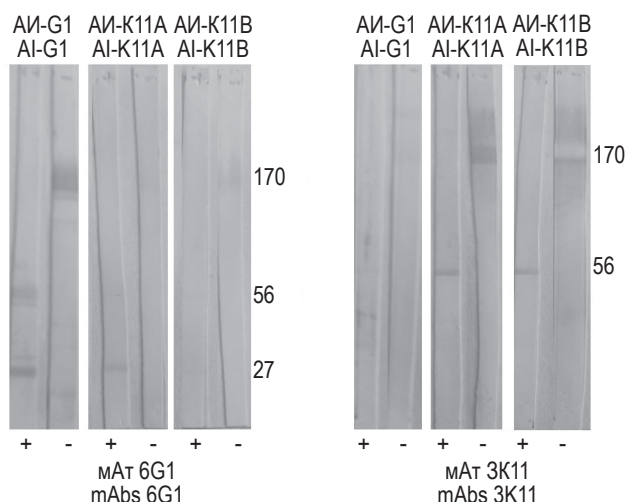


Рисунок 8. Результат вестерн-блот анализа связывания мышиных моноклональных антиидиотипических антител АИ-G1, АИ-K11А и АИ-K11В с мАт 6G1 и 3K11 (нагрузка белка 1 мкг на дорожку градиентного денатурирующего геля)

Примечание. «+» – восстанавливающие и «-» – невосстанавливающие условия.

Figure 8. Result of a Western blot analysis of mouse monoclonal anti-idiotypic antibodies AI-G1, AI-K11A and AI-K11B binding with mAbs 6G1 and 3K11 (protein loading 1 µg per track of denaturing gradient gel)

Note. "+" reducing and "-", non-reducing conditions.

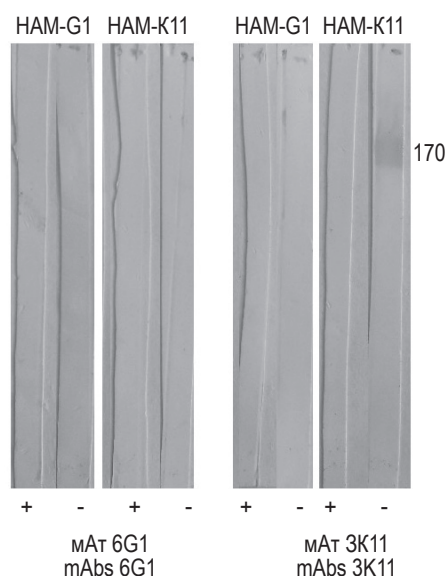


Рисунок 9. Результат вестерн-блот анализа связывания поликлональных антиидиотипических антител лошади НАМ-K11 и НАМ-G1 с мАт 6G1 и 3K11 (нагрузка белка 1 мкг на дорожку градиентного денатурирующего геля)

Примечание. «+» – восстанавливающие и «-» – невосстанавливающие условия.

Figure 9. Result of a Western blot analysis of horse polyclonal anti-idiotypic antibodies HAM-K11 and HAM-G1 binding with mAbs 6G1 and 3K11 (protein loading 1 µg per track of denaturing gradient gel)

Note. "+" reducing and "-", non-reducing conditions.

На рисунке 7 представлены электрофореграммы моноклональных Ab2-антител АИ-G1, АИ-K11А и АИ-K11В.

На рисунке 8 представлен результат вестерн-блот анализа связывания моноклональных Ab2-антител АИ-G1, АИ-K11А и АИ-K11В с мАт 6G1 и 3K11.

На рисунке 9 представлен результат анализа связывания поликлональных Ab2-антител лошади НАМ-K11 и НАМ-G1 с мАт 6G1 и 3K11 методом вестерн-блоттинга.

Обсуждение

Как видно из результатов, представленных на рисунке 2, использование предложенной схемы аффинного фракционирования сыворотки лошади, иммунизированной иммуноглобулинами 3K11 и 6G1, впервые позволило выделить три пула специфических антител: антивидовые Ab1-антитела НАМ, которые, разумеется, одинаково связываются со всеми сорбированными IgG мыши в твердофазном ИФА; Ab2-антитела НАМ-K11 и НАМ-G1, специфичные только к мАт-3K11 и мАт-6G1 соответственно. Тот факт, что полученные Ab2-антитела являются поликлональными, заставляет предположить их гетерогенность по антиидиотипическим свойствам, то есть присутствие в каждом пуле Ab2α, Ab2β и Ab2γ типов Ab2-антител. Кроме того, иммунизация мышей мышинными иммуноглобулинами к производным морфина впервые позволила получить к ним мышинные антиидиотипические антитела. Анализ данных, приведенных на рисунке 3, показал, что АИ-G1, АИ-K11А и АИ-K11В специфичны только к своим мАт, при этом специфичность антител АИ-K11В выше, чем АИ-K11А.

Как видно из результатов, представленных на рисунках 4, 5 и в таблице 3, антитела НАМ-G1 и АИ-G1А подавляют связывание конъюгата 6G1-Пх с ГСМ-БСА. При этом 50% точка подавления связывания близка к их эквимольному соотношению, что указывает на высокую специфичность процесса конкуренции идиотип – антиидиотип. В то же время эти антитела не подавляют связывание конъюгата 3K11-Пх с КММ-БСА. Антитела НАМ-K11, а также АИ-K11А и АИ-K11В имеют другую антиидиотипическую специфичность, подавляя связывание конъюгата 3K11-Пх с КММ-БСА и не подавляя связывание конъюгата 6G1-Пх с ГСМ-БСА. НАМ-K11 имеет более высокую специфичность, чем АИ-K11В. 50% точка подавления связывания 3K11-Пх с КММ-БСА для АИ-K11А наблюдается только при 50-кратном избытке.

На рисунке 6 представлены электрофореграммы трех фракций поликлональных антител лошади. Электрофоретический профиль аффинно выделенных антител, имеющих разную

специфичность, практически полностью совпадает. Наличие двух полос тяжелой цепи в восстановленных условиях и присутствии иммуноглобулинов с молекулярной массой более 225 кДа указывает на то, что, несмотря на длительную иммунизацию животных, в сыворотке лошади циркулируют не только IgG-иммуноглобулины, но и IgM.

По результатам изотипирования все полученные мАТ относятся к классу IgM, что согласуется с данными электрофореза АИ-G1, АИ-K11А и АИ-K11В (рис. 7). Обсчет показал, что молекулярная масса основной части препарата в невосстанавливающих условиях составляет около 800 кДа, то есть представлена пентамером иммуноглобулина класса IgM.

По результатам проведенного вестерн-блот анализа, представленным на рисунке 8, видно, что мАТ АИ-G1 распознают не только молекулу антитела 6G1 с молекулярной массой 160 кДа, но и его тяжелую и легкую цепи, которые участвуют в формировании идиотипа, ответственного за связывание с АИ-G1, и не распознают мАТ 3K11. АИ-K11А и АИ-K11В связывают цельную молекулу антитела 3K11 и его тяжелую цепь. По результатам анализа методом вестерн-блот-

тинга (рис. 9) поликлональные Ab2-антитела НАМ-K11 способны к распознаванию нефрагментированной молекулы мАТ 3K11. Вполне возможно, что лошадиные Ab2-антитела по причине своей поликлональности распознают конформационные детерминанты антиопиатных антител, которые в случае SDS-фореза в восстанавливающих условиях теряют свои антигенные свойства.

Таким образом, в результате проведенной работы были впервые получены и охарактеризованы поликлональные и моноклональные антиидиотипические Ab2-антитела к морфин-специфическим иммуноглобулинам. В ходе дальнейшей работы будет исследовано влияние полученных Ab2-антител на синтез ДНК в клетках глиобластомы человека линии T98G *in vitro* и проведено сравнение их биологического эффекта с действием морфина и налоксона. Также планируется проверить, обладают ли Ab2 свойствами вакцины, то есть способностью индуцировать появление антител, способных связывать производные морфина, при иммунизации ими животных. Будет также изучена возможность применения Ab2-антител в разработке тест-систем по определению антител, специфичных к опиатам.

Список литературы / References

1. Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Сергеева В.Е., Трофимов А.В., Кротов Г.И., Ульянова Л.И. Получение поликлональных и моноклональных антител к двум производным морфина // Вопросы наркологии, 2016. № 11-12. С. 39-54. [Berzina A.G., Gamaleya N.B., Sergeeva V.E., Trofimov A.V., Krotov G.I., Ulyanova L.I. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against two morphine derivatives. *Voprosy narkologii = Journal of Addiction Problems*, 2016, no. 11-12, pp. 39-54. (In Russ.)]
2. Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Ульянова Л.И., Шестаков К.А., Ульянова М.А., Капанадзе К.Д., Станкова Н.В., Ревякин А.О., Фокин Ю.В., Кротов Г.И., Родченков Г.М. Методологические подходы к разработке вакцины для лечения зависимости от опиатов // Наркология, 2015. № 11. С. 25-31. [Berzina A.G., Gamaleya N.B., Ulyanova L.I., Shestakov K.A., Ulyanova M.A., Kapanadze G.D., Stankova N.V., Revyakin A.O., Fokin Yu.V., Krotov G.I., Rodchenkov G.M. Methodological approaches to development of a vaccine for the treatment of opiate dependence. *Narkologiya = Narcology*, 2015, no. 11, pp. 25-31. (In Russ.)]
3. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Ульянова Л.И. Методологические основы создания вакцины для иммунотерапии зависимости от опиатов // Вопросы наркологии, 2017. № 4-5. С. 32-56. [Gamaleya N.B., Berzina A.G., Ulyanova L.I. Methodological bases for creating a vaccine for immunotherapy of opioid use disorder. *Voprosy narkologii = Journal of Addiction Problems*, 2017, no. 4-5, pp. 32-56. (In Russ.)]
4. Кулаев Д.В., Насибов С.М., Маркин С.С., Бобков Ю.Г., Семенов М.П. Хроматографический способ выделения альфа-фетопротеина. Патент на изобретение RU № 2094078, 1997. [Kulaev D.V., Nasibov S.M., Markin S.S., Bobkov Yu.G., Semenov M.P. Chromatographic method of alfa-fetoprotein isolation. Patent RU 2094078, 1997].
5. Jerne N.K., Cocteau J. Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol. Rev.*, 1984. Vol. 79, no. 1, pp. 5-24.
6. Ho M., Segre M. Inhibition of cocaine binding to the human dopamine transporter by a single chain anti-idiotypic antibody: its cloning, expression, and function properties. *BBA*, 2003, Vol. 1638, no. 3, pp. 257-266.
7. Mahmood T., Yang P.C. Western blot: technique, theory, and troubleshooting. *N. Am. J. Med. Sci.*, 2012, Vol. 4, no. 9, pp. 429-434.
8. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. Academic Press, 2008. 1323 p.
9. Pandey S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2010, Vol. 1, no. 1, pp. 88-94.
10. Schabacker D.S., Kirschbaum K.S., Serge M. Exploring the feasibility of an anti-idiotypic cocaine vaccine: analysis of the specificity of anticocaine antibodies (Ab1) capable of inducing Ab2 β anti-idiotypic antibodies. *Immunology*, 2000, Vol. 100, no. 1, pp. 48-56.
11. Walker J.M. Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1. Proteins. Ed. Clifton N.J. Humana Press, Inc., 1984, pp. 57-61.

Авторы:

Трофимов А.В. — руководитель группы лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Атанасян В.А. — старший научный сотрудник лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Ищенко А.М. — к.б.н., заведующий лабораторией биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Карabanова Е.А. — инженер лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Рак А.Я. — младший научный сотрудник лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России; аспирант ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

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

Гамалея Н.Б. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Берзина А.Г. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Станкова Н.В. — к.б.н., заведующая лабораторией спортивной медицины и экстремальных состояний ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Капанадзе Г.Д. — д.б.н., начальник научно-организационного отдела ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, п. Светлые горы, Красногорский район, Московская обл., Россия

Ульянова Л.И. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Климова Т.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Trofimov A.V., Head of a Research Group, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Atanesyan V.A., Senior Research Associate, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Ischenko A.M., PhD (Biology), Head, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Karabanova E.A., Engineer, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Rak A.Ya., Junior Research Associate, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency; Postgraduate Student, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Gamaleya N.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

Berzina A.G., PhD (Biology), Senior Research Associate, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

Stankova N.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Sports Medicine and Extreme Conditions, National Center of Biomedical Technologies, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Kapanadze G.D., PhD, MD (Biology), Head, Scientific Organization Department, National Center of Biomedical Technologies, Federal Medical-Biological Agency, Svetlye gory, Moscow Region, Russian Federation

Ulyanova L.I., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

Klimova T.A., PhD (Biology), Research Associate, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

Поступила 12.03.2019
Отправлена на доработку 30.10.2019
Принята к печати 01.11.2019

Received 12.03.2019
Revision received 30.10.2019
Accepted 01.11.2019

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С апреля 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 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»**.

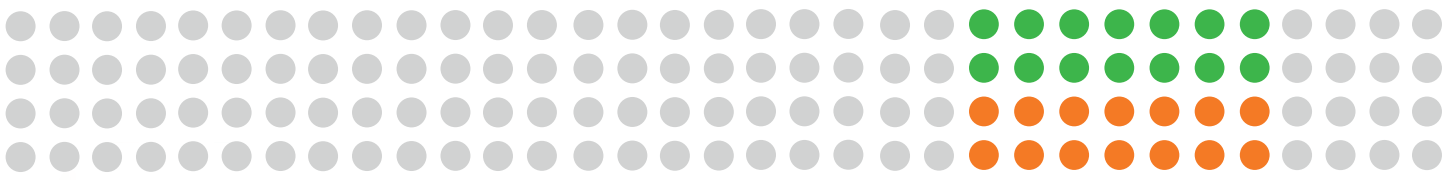
Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абасеева Т.Ю.	143	Гусев Е.Ю.	7	Ленёва И.А.	99	Рак А.Я.	187
Айрапетов М.И.	77	Гущин Я.А.	111	Лубнина Т.В.	165	Родионов Г.Г.	87
Артемова А.В.	123	Добрынина М.Т.	157	Луговая А.В.	123	Свитич О.А.	99
Атанесян В.А.	187	Еремеева А.В.	181	Луценко В.А.	171	Семенова Н.Ю.	87
Балацкая Н.В.	61	Ереско С.О.	77	Лыков А.П.	135	Сенникова С.В.	49
Берзина А.Г.	187	Журавлева Ю.А.	7	Макарова М.Н.	111	Симбирцев А.С.	187
Бондаренко Н.А.	135	Зотова Н.В.	7	Макаров В.Г.	111	Сорокина Л.Н.	181
Борисова О.В.	143	Ищенко А.М.	187	Макарова О.В.	157	Станкова Н.В.	187
Борщев В.Ю.	87	Калинина Н.М.	123	Махадеван Б.	111	Суворов А.Н.	87
Борщев Ю.Ю.	87	Калужин О.В.	111	Махмудова Н.Р.	99	Суровцева М.А.	135
Борщева О.В.	87	Капанадзе Г.Д.	187	Минасян С.М.	87	Топтыгина А.П.	49
Брежнева Е.В.	171	Карабанова Е.А.	187	Минеев В.Н.	181	Трофимов А.В.	187
Буровенко И.Ю.	87	Карасева А.Б.	87	Митрейкин В.Ф.	123	Ульянова Л.И.	187
Бычков Е.Р.	77	Карташова Н.П.	99	Михайлова Н.А.	143	Фалынскова И.Н.	99
Вафин И.А.	171	Ким И.И.	135	Мун С.А.	171	Федякина И.Т.	99
Вичаре А.С.	111	Климова Т.А.	187	Нероев В.В.	61	Фомичев А.В.	135
Воронина Е.Н.	171	Ковальчук Ю.П.	123	Нестеренко Л.Н.	143	Ченцова Е.В.	61
Гайдай Е.А.	111	Колпинский Г.И.	171	Нёма М.А.	181	Черешнев В.А.	7
Галагудза М.М.	87	Костянюк М.В.	171	Панфилов А.Б.	153	Чернявский А.М.	135
Гамалея Н.Б.	187	Крышень А.А.	111	Пестова И.В.	153	Шабанов П.Д.	77
Гао Ю.	157	Крышень К.Л.	111	Повешенко О.В.	135	Шакина Н.А.	165
Генералова Г.А.	143	Кудряшова А.М.	143	Поленок Е.Г.	171	Шамхалова Х.М.	61
Глубокова Е.А.	99	Куртасова Л.М.	165	Половинкин В.В.	87	Эмануэль Ю.В.	123
Глушков А.А.	171	Кухаренко А.Е.	111	Поромов А.А.	99		
Гордеева Л.А.	171	Лебедев А.А.	77	Постовалова Е.А.	157		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аваскулярность	62	инфекция	49	системное воспаление	7
авидность	144	кератопластика высокого риска	62	субпопуляционный состав	
алкоголизм	77	клеточный цикл	135	лимфоцитов	157
аллоимунитет	62	кожа	49	сыворотки крови человека	144
американская норка	153	конкурентный анализ	188	твёрдофазный ИФА	144
антибиотик-индуцированный дисбиоз	88	корреляция	165	тканевой стресс	7
антиидиотипические антитела	188	костномозговые мононуклеары	135	толерантность	62
антитела	144, 172, 188	лимфоидная ткань	153	толстая кишка	153
апоптоз	124, 135	лимфоцит	165	тонкая кишка	153
асептический лимфаденит	112	мозг	77	трансплантация	62
атеросклероз	7	моноклональные антитела	188	фактор некроза опухоли	112
бактериальные лизаты	112	мышь C57Bl/6	157	факторы транскрипции	181
бензо[а]пирен	172	нейровоспаление	77	фенотип	135, 165, 181
бляшка	153	нейродегенерация	7	ферменты	165
бронхиальная астма	181	опухолевые заболевания	7	фитогемагглютинин	124
воспаление	49, 112	осельтамивир	100	хронический язвенный колит	157
воспалительное заболевание толстой		острый язвенный колит	157	хроническое воспаление низкой	
кишки	88	отмена алкоголя	77	интенсивности	7
вторичная бактериальная пневмония	100	отторжение трансплантата	62	цефуроксим	100
гипертрофия глоточной миндалины	165	пневмония	112	цитокины	88, 100, 172
гиппокамп	77	поликлональные антитела	188	эритропоэтин	135, 144
грипп	100	половые различия	157	эстрадиол	172
дерматит	49	поляризация макрофагов	7	ACAID	62
изолированное сердце	88	прогестерон	172	C-пептид	124
иммуногенность	144	производные морфина	188	<i>Staphylococcus aureus</i>	100
иммуноглобулин А	112	пролиферация	135	STAT4	181
иммунорегуляция	112	псориаз	49	STAT6	181
иммуностимуляция	112	размер инфаркта	88	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	112
иммуноферментный анализ	188	рак молочной железы	172	T-лимфоциты	124
Имудон®	112	рецепторы-мусорщики	7	T-bet	181
инсулин	124	роговица	62	Toll-подобные рецепторы	77
интерлейкин-36	49	сахарный диабет 1 типа	124	Treg-лимфоциты	62
				β-клетки	124



Медипал Онко

*Предоставление высококачественных
товаров и услуг, позволяющих
людям быть здоровыми*

МЕДИПАЛ-ОНКО
современная фармацевтическая
дистрибьюторская компания,
осуществляющая
комплексное обеспечение
учреждений системы
здравоохранения инновационными
лекарственными средствами
и изделиями медицинского назначения
на территории России,
стран СНГ и дальнего зарубежья.

Иммунобиология	●	Эндокринология
Трансплантология	●	Орфанные заболевания
Акушерство и гинекология	●	Расстройства гемостаза
Онкология и онкогематология	●	Реанимация и анестезиология
Изделия медицинского назначения	●	Технические средства реабилитации

Здоровый взгляд на жизнь!

Адрес: 115230, Москва, Варшавское шоссе, д. 47, корп. 4
Тел.: +7 (495) 662-84-94 Факс +7 (495) 662-84-95
e-mail: public@medipal-onko.ru www.medipal-onko.ru

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

