

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

Том 22, № 4. С. 603-820

2020

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Расширенный поиск

ГЛАВНАЯ

О ЖУРНАЛЕ

ТЕКУЩИЙ ВЫПУСК

АРХИВЫ

ОБЪЯВЛЕНИЯ



Журнал является официальным изданием Российского научного общества иммунологов.

ISSN 1028-7221

Основан в 1996 г.

Периодичность: 4 раза в год

Главный редактор: академик РАН В.А. Черешнев

Включен в перечень изданий, рекомендованных ВАК для публикации научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата и

[Читать далее](#)



Отправить статью

[Правила для авторов](#)

[Редакционная коллегия](#)

[Редакционный совет](#)

[Рецензирование](#)

[Этика публикаций](#)

ТЕКУЩИЙ ВЫПУСК

Том 23, № 1 (2020)

[Скачать выпуск](#) PDF



ЮБИЛЕЙ

РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ С ГЛУБОЧАЙШИМ ПОЧТЕНИЕМ И БЛАГОДАРНОСТЬЮ ОТ ИМЕНИ ВСЕХ ИММУНОЛОГОВ РОССИИ И СТРАН БЫВШЕГО СОВЕТСКОГО СОЮЗА ПОЗДРАВЛЯЕТ ОСНОВОПОЛОЖНИКА ИММУНОЛОГИИ В НАШИХ СТРАНАХ РЭМА ВИКТОРОВИЧА ПЕТРОВА, БЕССМЕННОГО ПОЧЕТНОГО ПРЕЗИДЕНТА РНОИ, С ЗАМЕЧАТЕЛЬНЫМ 90-ЛЕТИЕМ ЮБИЛЕЕМ!

статья Редакционная

[PDF \(RUS\)](#)

7-8 2

[Аннотация](#) ▾

ОБЗОРЫ

САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА – АУТОИММУННОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ?

Н. С. Асфандиярова

[PDF \(RUS\)](#)

9-18 13

[Аннотация](#) ▾

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ АКНЕ

А. Г. Румянцев, О. М. Демина, Е. В. Райкина

[PDF \(RUS\)](#)

19-26 7

[Аннотация](#) ▾

ПОПУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ ГОЛОГО ЗЕМЛЕКОПА

Том 22, № 1 (2019)

ТСR-МУТАЦИИ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ИММУННЫЙ СТАТУС У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ, В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ

Том 22, № 1 (2019)

ВЛИЯНИЕ ПОЛИОКСИДОНИЯ, Poly(I:C), ДАЛАРГИНА НА ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВАКЦИННОГО ШТАММА YERSINIA PESTIS EV НИИЭГ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧУМЕ

Том 23, № 1 (2020)

САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА – АУТОИММУННОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ?

Том 23, № 1 (2020)

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА СМЕРТИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Том 21, № 1 (2018)

- Электронная редакция**
- Подача статей online**
- Проверка рукописей на АНТИПЛАГИАТ**

- Online-версия журнала**
- DOI для каждой публикации**
- Весь архив в PDF-формате**
- Поиск статей по ключевым словам, авторам, заглавиям**

«Российский иммунологический журнал» входит в «Перечень российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук», а также в базу Russian Science Citation Index (RSCI), полностью интегрированную с платформой Web of Science

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

июль-август

2020, том 22

№ 4

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

Тотолян Арег Артемович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии, 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

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spbiraaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197101, Санкт-Петербург, а/я 130.

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 25.06.2020 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 27,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1062

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

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

Тел.: (812) 950-10-99.

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

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

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

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

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

Михалеk 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

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 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**

July-August

2020, volume 22

No. 4

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Editorial Board

Ludmila A. Goriachkina – PhD, MD, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Clinical 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. Chukhlovin, PhD, MD

Online version editorial manager:

Erofeeva V.S.

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

Address for correspondence:

197101, St. Petersburg, P.O. Box 130.

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, Malyi ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 25.06.2020. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 27,25. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

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

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

Editorial Council

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

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

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

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Ширинский В.С., Ширинский И.В.

ПОЛИМОРБИДНОСТЬ, СТАРЕНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И СИСТЕМНОЕ ВЯЛОТЕКУЩЕЕ ВОСПАЛЕНИЕ – ВЫЗОВ СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЕ 609

Оригинальные статьи

Максимова А.А., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

ПРОДУКЦИЯ ФАКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ФИБРОЗА, РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА 625

Кореньевский А.В., Щербицкая А.Д., Березкина М.Э., Маркова К.Л., Александрова Е.П., Балабас О.А., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ КЛЕТОК ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ ЛИНИИ NK-92 С ПОМОЩЬЮ MALDI-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ 633

Фомичева Е.Е., Шанин С.Н., Филатенкова Т.А., Серебряная Н.Б.

IL-2 КАК РЕГУЛЯТОР УРОВНЕЙ СТРЕСС-ГОРМОНОВ И НЕЙРОТРОПНОГО ФАКТОРА BDNF ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ 647

Шишкин В.И., Назаров П.Г., Маленков Ю.А., Шишкин В.В., Кудрявцева Г.В., Картунен А.А.

О СООТНОШЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЕЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ НА ОТДЕЛЬНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА В НОРМЕ И ПРИ СИСТЕМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ 657

Ганковская Л.В., Стаховская Л.В., Греченко В.В., Кольцова Е.А., Уварова О.С., Демина М.Д., Громова Т.В., Светлич О.А.

ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ TLR2 И TLR4 У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ 665

Морозов С.А., Тихонова М.А., Пронкина Н.В., Штоббе А.А., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Останин А.А., Черных Е.Р.

БАЛАНС CD4⁺IFN γ ⁺ И CD4⁺CD25^{hi}T-КЛЕТОК КАК РАННИЙ ПРЕДИКТОР 3-МЕСЯЧНОГО ИСХОДА У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ 675

Мягкова М.А., Петроченко С.Н., Орлова Е.А., Крылов А.С., Мосейкин И.А.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ОЦЕНКЕ ХРОНИЧЕСКОГО БОЛЕВОГО СИНДРОМА 685

Порядин Г.В., Захватов А.Н., Тарасова Т.В., Хайдар Д.А., Тимошкин В.О.

ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СИНОВИТЕ НА ФОНЕ СИСТЕМОГО И ВНУТРИСУСТАВНОГО ПРИМЕНЕНИЯ НПВС И ОЗОНА 693

Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю.

КОНГРУЭНТНОСТЬ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ ИММУННОЙ И НЕРВНОЙ СИСТЕМ У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА В СРАВНЕНИИ С РАССТРОЙСТВАМИ ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА 703

Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Петричук С.В., Потапов А.С., Сурков А.Н.

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ANTI-GR2 АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И КОПРОФИЛЬТРАТАХ У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА 717

Пивоварова Л.П., Громов М.И., Тулупов А.Н., Лапшин В.Н., Осипова И.В., Ариксина О.Б., Никитин А.В., Малышев М.Е., Маркелова Е.В.

ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАТА НАТРИЯ НА ПРОТИВОИНФЕКЦИОННУЮ ЗАЩИТУ И КРОВЕТВОРЕНИЕ У ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ С ПОЛИТРАВМОЙ (РАНДОМИЗИРОВАННОЕ ПРОСПЕКТИВНОЕ, ДВОЙНОЕ СЛЕПОЕ ПЛАЦЕБО-КОНТРОЛИРУЕМОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ) 729

Кологривова Е.Н., Плешко Р.И., Щербик Н.В., Староха А.В., Чичинскас Э.

ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ИМУНОФАНА НА АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ ПРИ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ЭКССУДАТИВНОГО СРЕДНЕГО ОТИТА У ДЕТЕЙ 741

Кречетова Л.В., Вторушина В.В., Индияева Е.В., Ванько Л.В., Николаева М.А., Тетруашвили Н.К.

ВЛИЯНИЕ ИММУНОЦИТОТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЖЕНЩИН С ИДИОПАТИЧЕСКИМ ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ 751

Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Бацунов О.К., Семенов А.В., Тополян Арег А.

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЖИТЕЛЕЙ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ 765

Краткие сообщения

Вавилова Ю.Д., Бойко А.А., Коваленко Е.И., Гречихина М.В., Шустова О.А., Ажикина Т.Л., Сапожников А.М.

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ CLIC1, MSH5, C6orf26, C6orf25 С УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА HSPA1B 779

Козлов В.А., Борисов А.Г., Савченко А.А., Кондаков А.Е., Кудрявцев И.В.

СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ЖЕНЩИН ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА «ПРОВАГ» 785

Костинов М.П., Зорин Н.А., Кажарова С.В., Зорина В.Н.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ ВЛИЯНИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА КОНЦЕНТРАЦИИ ИНГИБИТОРОВ ГИДРОЛАЗ И ЛАКТОФЕРРИНА ПРИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЯХ У ВЗРОСЛЫХ 791

Сизякина Л.П., Андреева И.И., Данилова Д.И.

ЗНАЧИМОСТЬ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ОБЕСПЕЧЕНИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ ОБЩЕВАРИАбельной ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ 799

Солдатенкова А.В., Кудряшова А.М., Гагрилова Н.Ф., Яковлева И.В., Борисова О.В., Свиридов В.В., Михайлова Н.А.

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ГИБРИДНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА PSEUDOMONAS AERUGINOSA 805

Беляева С.В., Сташкевич Д.С., Бурмистрова А.Л.

КОМБИНАЦИИ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ 811

Некролог 816

Правила для авторов 817

Авторский указатель 820

Предметный указатель 820

CONTENTS

Reviews

Shirinsky V.S., Shirinsky I.V.

POLYORBIDITY, AGEING OF IMMUNE SYSTEM AND LOW-GRADE SYSTEMIC INFLAMMATION: A CHALLENGE FOR MODERN MEDICINE 609

Original articles

Maksimova A.A., Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

PRODUCTION OF FACTORS INVOLVED INTO FIBROSIS REGULATION BY VARIOUS TYPES OF HUMAN MACROPHAGES 625

Korenevsky A.V., Shcherbitskaya A.D., Berezkina M.E., Markova K.L., Alexandrova E.P., Balabas O.A., Selkov S.A., Sokolov D.I.

MALDI-TOF MASS SPECTROMETRIC PROTEIN PROFILING OF MICROVESICLES PRODUCED BY THE NK-92 NATURAL KILLER CELL LINE 633

Fomicheva E.E., Shanin S.N., Filatenkova T.A., Serebryanaya N.B.

IL-2 AND REGULATION OF STRESS HORMONES AND BDNF NEUROTROPIC FACTOR LEVELS AFTER EXPERIMENTAL TRAUMATIC BRAIN INJURY (TBI) 647

Shishkin V.I., Nazarov P.G., Malenkov Yu.A., Shishkin V.V., Kudryavtseva G.V., Kartunen A.A.

RELATIONSHIP BETWEEN VARIOUS PATHWAYS OF CELLULAR DEATH AT DISTINCT STAGES OF ONTOGENESIS IN NORMAL STATE AND SYSTEMIC DISEASES OF CONNECTIVE TISSUE 657

Gankovskaya L.V., Stakhovskaya L.V., Grechenko V.V., Koltsova E.A., Uvarova O.S., Demina M.D., Gromova T.V., Svitich O.A.

HYPEREXPRESSION OF TLR2 AND TLR4 IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE IN ACUTE PERIOD OF THE DISEASE 665

Morozov S.A., Tikhonova M.A., Pronkina N.V., Shtobbe A.A., Leplina O.Yu., Shevela E.Ya., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

BALANCE OF CD4⁺IFN γ ⁺ AND CD4⁺CD25^{hi}T CELLS AS EARLY PREDICTOR OF A 3-MONTH OUTCOME IN ISCHEMIC STROKE PATIENTS 675

Myagkova M.A., Petrochenko S.N., Orlova E.A., Krylov A.S., Moseykin I.A.

IMMUNOLOGICAL INDEXES IN EVALUATION OF CHRONIC PAIN SYNDROME 685

Poryadin G.V., Zakhvatov A.N., Tarasova T.V., Khaydar D.A., Timoshkin V.O.

CYTOKINE STATUS IN POSTTRAUMATIC SYNOVITIS ON THE BACKGROUND OF SYSTEMIC AND INTRA-ARTICULAR USE OF NSAID AND OZONE 693

Burmistrova A.L., Filippova Yu.Yu.

CONGRUENCY AND PHENOTYPIC PLASTICITY OF IMMUNE AND NERVOUS SYSTEMS IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS COMPARED TO SCHIZOPHRENIA SPECTRUM DISORDERS 703

Toptygina A.P., Semikina E.L., Petrichuk S.V., Potapov A.S., Surkov A.N.

DIAGNOSTIC VALUE OF ANTI-GP2 ANTIBODIES DETERMINED IN SERUM AND COPROFILTRATES IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE 717

Pivovarova L.P., Gromov M.I., Tulupov A.N., Lapshin V.N., Osipova I.V., Ariskina O.B., Nikitin A.V., Malyshev M.E., Markelova E.V.

INFLUENCE OF SODIUM DESOXYRIBONUCLEATE ON ANTI-INFECTIOUS PROTECTION AND HEMATOPOIESIS IN PATIENTS WITH POLYTRAUMA (RANDOMIZED PROSPECTIVE, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED STUDY) 729

Kologrivova E.N., Pleshko R.I., Scherbik N.V., Starokha A.V., Chichinskas E.

EFFECTS OF INTRANASAL IMMUNOFAN ADMINISTRATION UPON PHAGOCYTOCYTIC ACTIVITY IN TREATMENT OF EXUDATIVE OTITIS MEDIA IN CHILDREN 741

Krechetova L.V., Vtorushina V.V., Inviyaeva E.V., Nikolaeva M.A., Vanko L.V., Tetrushvili N.K.

EFFECT OF IMMUNOCYTOTHERAPY ON THE STATE OF THE IMMUNE SYSTEM OF WOMEN WITH IDIOPATHIC HABITUAL MISCARRIAGE 751

Arsentjeva N.A., Lyubimova N.E., Batsunov O.K., Semenov A.V., Totolian Areg A.

ANALYSIS OF BLOOD PLASMA CYTOKINE PROFILE IN HEALTHY RESIDENTS OF THE REPUBLIC OF GUINEA 765

Short communications

Vavilova Yu.D., Boyko A.A., Kovalenko E.I., Grechikhina M.V., Shustova O.A., Azhikina T.L., Sapozhnikov A.M.

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF THE POLYMORPHISM OF THE *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25* GENES WITH THE EXPRESSION LEVEL OF THE *HSPA1B* GENE 779

Kozlov V.A., Borisov A.G., Savchenko A.A., Kondakov A.E., Kudryavtsev I.V.

STATE OF THE IMMUNE SYSTEM IN WOMEN USING THE "PROVAG" PROBIOTIC 785

Kostinov M.P., Zorin N.A., Kazarova S.V., Zorina V.N.

COMPARATIVE EFFECT OF IMMUNOMODULATORS ON THE CONTENTS OF HYDROLASE INHIBITORS AND LACTOFERRIN IN COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN ADULTS 791

Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Danilova D.I.

IMPORTANCE OF CELLULAR IMMUNITY LINK FOR EFFICIENCY OF REPLACEMENT THERAPY IN COMMON VARIABLE IMMUNE DEFICIENCY 799

Soldatenkova A.V., Kudryashova A.M., Gavrilova N.F., Yakovleva I.V., Borisova O.V., Sviridov V.V., Mikhailova N.A.

DEVELOPMENT OF ELISA TEST FOR THE QUALITY CONTROL OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* RECOMBINANT VACCINE BASED ON THE HYBRID RECOMBINANT PROTEIN 805

Belyaeva S.V., Stashkevich D.S., Burmistrova A.L.

COMBINATIONS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES AND THEIR INTERACTIONS IN RUSSIAN TUBERCULOSIS PATIENTS IN THE CHELYABINSK REGION 811

Obituary 816

Instructions to Authors 817

Author index 820

Subject index 820

ПОЛИМОРБИДНОСТЬ, СТАРЕНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И СИСТЕМНОЕ ВЯЛОТЕКУЩЕЕ ВОСПАЛЕНИЕ – ВЫЗОВ СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЕ

Ширинский В.С., Ширинский И.В.

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

Резюме. В обзоре анализируются данные литературы, посвященной характеристике полиморбидности, ее взаимосвязи со старением иммунной системы и низкоуровневым воспалением старения, механизмам их развития и путям поиска методов профилактики и лечения возраст-ассоциированных заболеваний. Прослежена эволюция понятий «коморбидность» и «полиморбидность», дано современное определение полиморбидности, показано, что распространенность полиморбидности растет во всем мире и в настоящее время достигает 23-25% общего числа населения и до 98% — у людей в возрасте 65 лет и старше. Анализируются факторы риска развития полиморбидности, ее социальное бремя, которое определяется высокой нагрузкой на учреждения здравоохранения, повышенной частотой летальных исходов, избыточным лечением, обусловленным участием специалистов разного профиля. Приводятся доказательства того, что старение и полиморбидность связывают сходные молекулярные и клеточные механизмы, объединенные понятием “inflammaging” (инфламэйджинг — ИЭ), которое представляет собой вялотекущее хроническое системное воспаление при старении. Представлены данные, свидетельствующие о том, что в развитии ИЭ принимают участие стареющие клетки врожденного и адаптивного иммунитета, различные про- и противовоспалительные медиаторы, пожизненная антигенная нагрузка. Анализируются сведения о функциональных и структурных изменениях врожденной и адаптивной иммунной системы при старении, роли этих изменений в персистенции ИЭ и возникновении полиморбидных заболеваний. Показано, что существует сложная взаимосвязь между старением всего организма и старением иммунной системы, механизмы которых в ряде случаев почти идентичны, в других сильно отличаются, возникают совместно, взаимно влияя друг на друга. С течением возраста, при наличии факторов риска, измененный адаптивный иммунитет большинства людей не способен полноценно справиться с хронической антигенной нагрузкой, что увеличивает риск развития болезней. С другой стороны, у многих пожилых людей эти изменения компенсируются постоянной активацией клеток врожденного иммунитета. Подчеркивается, что процесс старения и возникновение болезни (полиморбидности) нельзя рассматривать как отдельные явления, поскольку они, существенно отличаясь по своей природе, могут взаимодействовать. В перспективе следует сосредоточить усилия на выяснении молекулярных и клеточных механизмов этих взаимодействий, решении задач, направленных на разработку таких вмешательств, которые были бы способны уменьшать вредные последствия старения и использовать полезные эффекты для сохранения здоровья и достижения максимальной продолжительности жизни.

Ключевые слова: полиморбидность, старение, инфламэйджинг, врожденный иммунитет, адаптивный иммунитет, хроническая антигенная нагрузка

Адрес для переписки:

Ширинский Иван Валерьевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630047, Россия, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6.
Тел.: 8 (923) 107-51-00.
Факс: 8 (383) 228-25-47.
E-mail: ivan.shirinsky@gmail.com

Address for correspondence:

Shirinsky Ivan V.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630047, Russian Federation, Novosibirsk, Zalessky str., 6.
Phone: 7 (923) 107-51-00
Fax: 7 (383) 228-25-47.
E-mail: ivan.shirinsky@gmail.com

Образец цитирования:

В.С. Ширинский, И.В. Ширинский «Полиморбидность, старение иммунной системы и системное вялотекущее воспаление — вызов современной медицине» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 609-624. doi: 10.15789/1563-0625-PAO-2042
© Ширинский В.С., Ширинский И.В., 2020

For citation:

V.S. Shirinsky, I.V. Shirinsky “Polymorbidity, ageing of immune system and low-grade systemic inflammation: a challenge for modern medicine”, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 609-624. doi: 10.15789/1563-0625-PAO-2042

DOI: 10.15789/1563-0625-PAO-2042

POLYMORBIDITY, AGEING OF IMMUNE SYSTEM AND LOW-GRADE SYSTEMIC INFLAMMATION: A CHALLENGE FOR MODERN MEDICINE

Shirinsky V.S., Shirinsky I.V.

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

Abstract. The review article considers the data from literature that concern polymorbidity aspects, its interrelations with ageing of immune system and low-grade immune ageing, mechanisms of genesis, approaches to its prevention and treatment. Evolution of “comorbidity” and “polymorbidity” terms is traced, an updated definition of polymorbidity is proposed. The world-wide incidence of polymorbidity is increased and now it reaches 23-25% in general population, and up to 98%, in elderly people (> 65 years old). The risk factors of polymorbidity are considered, like as its social burden due to high costs for healthcare, high mortality rates, excessive treatment provided by multidisciplinary specialists. We present evidence for common molecular and cellular mechanisms involved in ageing and polymorbidity, being unified by the term “inflammaging” which represents a low-grade chronic systemic inflammation associated with ageing. The data are presented that concern the “inflammaging” development with involvement of ageing cells from innate and adaptive immunity systems, different pro- and anti-inflammatory mediators, lifelong antigenic load. The data are analyzed concerning functional and structural changes in the inborn and adaptive immune system in ageing, role of these changes in “inflammaging” persistence and development of polymorbid conditions. There are complex interactions shown between the bodily senescence and immune ageing, with similar underlying mechanisms in some cases, however, being quite different in other instances. With age, upon existing risk factors, the changed adaptive immunity in most people is not able to full-scale coping with chronic antigenic load, thus increasing the risk of diseases. Moreover, in many elderly people these changes are compensated by steady activation of the innate immunity cells. It is noted that the aging events and development of disease (polymorbidity) cannot be considered distinct entities, since they can interact, being, however, basically different in their nature. In future, one should concentrate our efforts on elucidation of molecular and cellular mechanisms of these interactions, solution of the tasks oriented for development of such interventions that could be able to reduce harmful consequences of ageing and to use useful effects for health maintenance and reaching maximal longevity.

Keywords: polymorbidity, ageing, inflammaging, innate immunity, adaptive immunity, chronic antigen load

Введение

Сегодняшний этап развития медицины характеризуется преобладанием в структуре хронических неинфекционных болезней человека не одной нозологической формы заболевания, а нескольких («коморбидность», «мультиморбидность», «полипатия», «плюрипатология» и др.) [7]. Распространенность полиморбидности значительно повышается с возрастом, хотя и не ограничивается пожилыми людьми [15, 104]. Старение является фактором риска формирования полиморбидности, в свою очередь, возникновение нескольких заболеваний свидетельствует о раннем старении [36]. Патологическая основа взаимосвязи старения и полиморбидности — вялотекущее системное воспаление и структурно-функциональные изменения в иммунной системе [33, 40, 46]. Вопросы патогенеза сочетанных возраст-ассоциированных заболеваний, их эффективное и ресурсосберегающее долгосрочное лечение являются одной из самых актуальных проблем медицины и здравоохранения,

с которыми сталкиваются пациенты, ученые, работники здравоохранения и общество в целом [7, 20]. **Целью обзора** является анализ данных литературы, посвященных изучению характеристик полиморбидности, ее взаимосвязи со старением иммунной системы и низкоуровневым воспалением старения и путям поиска методов профилактики и лечения возраст-ассоциированных заболеваний.

Понятия «коморбидность» и «полиморбидность»

В отечественной и зарубежной литературе можно встретить различные термины для определения сочетанных заболеваний человека: «коморбидность», «полиморбидность», «мультиморбидность», «двойной диагноз», «соболезность», «плюрипатология» и пр. Наиболее часто встречаются термины «коморбидность» и «полиморбидность» [3, 5], появление этих терминов разделено временем. Термин «коморбидность» (лат. со — «вместе» и morbus — «болезнь») предложен Feinstein A. в 1970 г. [37]. Автор полагал, что коморбидность — это «любая отчетливая дополнительная клиническая картина, которая существо-

вала или может возникнуть у больного во время клинического течения основного (индексного) заболевания». В этом определении ключевыми словами являются «индексное (основное) заболевание». Однако реалии клинической практики привели к тому, что в 1998 г. van den Akker M. и соавт. предложили называть наличие у больного двух и более заболеваний одновременно, безотносительно к основному заболеванию, полиморбидностью [103]. При изучении полиморбидности не выделяют «индексную болезнь», а рассматривают все заболевания, имеющиеся у конкретного пациента, как равнозначные и взаимосвязанные, вне зависимости от этиологии и патогенеза, времени возникновения [3]. Таким образом, в основе полиморбидности, в отличие от коморбидности, лежит не сопутствующая основному заболеванию новая болезнь, а конкретный пациент с множеством приобретенных хронических заболеваний, находящихся между собой в сложнейших взаимоотношениях (сходство и различия этиопатогенеза, патоморфоз, ятрогенные влияния и др.), о механизмах которых мы пока еще очень мало знаем.

В 2013 г. был опубликован систематический обзор данных литературы, подготовленный восьмью национальными командами Европейской сети исследователей общей практики. В базах данных PubMed, Embase и Cochrane за 1990-2010 гг. были отобраны 54 статьи, содержащие описания критериев полиморбидности [59]. Участники работы нашли 132 (!) определения полиморбидности с различными критериями. Анализ и обобщение результатов исследования позволили авторам дать следующее определение полиморбидности: «Полиморбидность – любая комбинация хронического заболевания, по меньшей мере, с одним другим заболеванием (острым или хроническим) и/или био-психосоциальными, соматическими факторами риска (связанными или нет) развития еще какого-либо заболевания». В этом определении ключевыми словами являются не только наличие двух и более заболеваний, а также доказанные и идентифицированные факторы риска их возникновения (многомерная концепция мультиморбидности). Последнее представляется очень важным при организации комплексного лечения больных с полиморбидностью, поскольку предусматривает вмешательства, направленные на устранение или минимизацию действия факторов риска. Описанный подход прослеживается при определении полиморбидности в рекомендациях Национального института здоровья и качества медицинской помощи Великобритании 2016 года (NICE) «Мультиморбидность: клиническая оценка и регулирование». В этом документе мультиморбидность рассматривается

как ≥ 2 длительно существующих заболеваний (к примеру, диабет и шизофрения), а также временные состояния (неспособность к обучению), некоторые синдромы – хроническая боль и др. [62].

Чтобы избежать путаницы в определениях «коморбидность», «мультиморбидность», с января 2018 года в Медицинские предметные рубрики (Medical Subject Headings), обновляемые Национальной медицинской библиотекой США, наряду с термином «коморбидность», теперь входит термин «мультиморбидность».

Таким образом, полиморбидность – понятие более широкое, чем коморбидность. Предполагается, что причины, приводящие к сочетанию нескольких заболеваний, разнородны и могут быть описаны четырьмя основными вариантами [69]. Во-первых, одно заболевание может быть причиной другого заболевания. Во-вторых, два заболевания могут иметь общие гены предрасположенности и факторы риска и/или общие механизмы патогенеза. В-третьих, два заболевания могут не иметь причинно-следственной связи или имеют только слабую ассоциацию. В-четвертых, одно заболевание может быть вызвано ятрогенными факторами, возникшими в связи с лечением другого заболевания [59]. Мы еще очень плохо знаем конкретные механизмы формирования полиморбидности при четырех предполагаемых вариантах, но на второй хотелось бы обратить внимание читателя. Еще в 1922 г. немецкие врачи – исследователи М. Пфаундлер и В. фон Зехт, на основе собственных клинических наблюдений, впервые предложили термины «синтропия», под которым они понимали «взаимную склонность», «притяжение» двух и более болезней и «дистропия» – взаимное отталкивание нескольких болезней [20]. В то время авторы не смогли дать удовлетворительное объяснение механизмам «притяжения» – частого сочетания болезней и «отталкивания» – редкого сочетания болезней.

В 1998 г. van den Akker и соавт. установили, что некоторые заболевания имеют тенденцию группироваться в кластеры [103]. Было показано, что большее количество людей, чем ожидалось, либо не имели никакого заболевания, либо имели 4 заболевания и более, в то время как меньше людей, чем предполагалось, имели 1 или 2 заболевания. Эти данные позволили предположить, что некоторые люди более восприимчивы к нескольким заболеваниям («ассоциативная мультиморбидность»), вероятно, вследствие «синтропии» по М. Пфаундлер и В. фон Зехт, в то время как другие являются устойчивыми к сочетанным болезням. В 2008 г. академик Пузырев В.П. дал следующее определение синтропии: «Синтропия – это природно-видовое явление сочетания у человека и его ближайших родственников двух и более

патологических состояний (нозологий или синдромов), имеющее эволюционно-генетическую основу. Синтропии — лишь часть полипатий, они включают этиологически и патогенетически связанные сочетания болезней («семейство болезней») [6]. В этом определении подчеркивается, что синтропия — лишь та часть полиморбидных заболеваний, которые этиологически и патогенетически взаимосвязаны.

Частота и социальное бремя полиморбидности

Показано, что распространенность полиморбидности растет во всем мире и в настоящее время достигает 23-25% общего числа населения и до 98% — у людей в возрасте 65 лет и старше [15, 65]. Кроме того, 55% пациентов с хроническими заболеваниями являются полиморбидными [106]. Хотя полиморбидность встречается у лиц молодого и среднего возраста, ее распространенность значительно повышается в пожилом возрасте [7]. По данным исследования, в Шотландии полиморбидность регистрируется в 30,4% случаях у лиц в возрасте от 45 до 64 лет, в 64,9% — в возрасте от 65 до 84 лет, 81,5% — в возрасте 85 лет и старше [15]. В Нидерландах 13% населения страдает мультиморбидностью, у лиц старше 55 лет она выявляется в 37% случаев [106]. Исследования, проведенные в Великобритании, демонстрируют наличие полиморбидности в 23% случаях местных жителей, у людей старше 65 лет она определяется в 70% случаев, причем частота трех и более заболеваний в этой подгруппе достигает 47% [62]. Частота полиморбидности среди населения Дании составляет 7,1% [102]. Из доклада Минздрава России «О состоянии системы здравоохранения РФ в 2013 году» следует, что критериям полиморбидности отвечают более 44% взрослого населения нашей страны со средним числом обращений к врачу 9,5 на 1 человека в год [4].

Факторами риска полиморбидности является женский пол [26], низкий социально-экономический статус и более низкий уровень образования [26, 106]. Исследование, проведенное в Великобритании, показало, что люди, живущие в бедных районах, значительно чаще страдают сочетанными заболеваниями в среднем возрасте, чем те, кто живет в богатых районах. Эти лица становятся полиморбидными на 10-15 лет раньше, чем их сверстники из более состоятельных семей [62]. Показано, что ожирение также является фактором риска полиморбидности у людей среднего возраста и пожилых [19]. Доказательство связи полиморбидности с уровнем физической активности было получено в результате перекрестного исследования, проведенного в Испании в 2009 г., на выборке 22 190 взрослых в возрасте старше 15 лет. Установлена обратная связь между мультиморбидностью и физиче-

ской активностью в самой молодой (16-44 года) и самой старшей (более 44 лет) возрастных группах [28].

Социальное бремя полиморбидности определяется высокой нагрузкой на учреждения здравоохранения, повышенной частотой летальных исходов, избыточным лечением, обусловленным участием специалистов разного профиля. Так, в Германии пациенты с множественными заболеваниями имели в два раза больше визитов в год к врачам, чем пациенты без мультиморбидности (36 против 16) [104]. Визиты были связаны с посещениями 5,7 разных специалистов в год в случае полиморбидности — против 3,5, когда полиморбидность отсутствовала. Число визитов и число врачей неуклонно возрастало с увеличением количества хронических заболеваний. Частота посещений врача варьировала от 35 до 54 в год, а количество специалистов колебалось от 5 до 7. Примечательно, что влияние пола или возраста на частоту обращений было небольшим. На пациентов с полиморбидностью приходилось 52,9% консультаций врачей общей практики, 78,7% назначений и 56,1% случаев госпитализации [26].

Систематизированный обзор и метанализ 26 статей, посвященных ассоциации мультиморбидности и смертности, выявил положительную связь между мультиморбидностью и летальностью (отношение рисков 1,44 (95% ДИ: 1,34-1,55) [74]). По сравнению с больными без мультиморбидности у больных с 2 заболеваниями риск смерти возрастал до 1,73 (95% ДИ: 1,41-2,13), а у больных с 3 и более заболеваниями до 2,72 (95% ДИ: 1,81-4,08).

В Дании оценили ассоциацию полиморбидности и смертности от наиболее распространенных комбинаций (2-5 групп) заболеваний [112]. Все комбинации имели повышенный риск летальности, причем у некоторых из них риск повышался в шесть раз. Смертность увеличивалась с увеличением числа заболеваний. Большинство комбинаций не увеличивали частоту летальности выше ожидаемой, то есть были скорее аддитивными, чем синергичными. В РФ среди пациентов с декомпенсацией хронической сердечной недостаточности, представленных в регистре ОРАКУЛ-РФ, наиболее высокая летальность в течение года наблюдалась именно у полиморбидных больных: летальность при сочетании с пневмонией составила 49,5%, циррозом печени — 45,7%, хронической болезнью почек — 47,2% [1].

Лечение пациентов с полиморбидностью в настоящее время является сложной задачей и осуществляется врачами различных специальностей. В некоторых случаях эффективное лечение одного заболевания может улучшить результаты лечения другого заболевания. Показано, что фар-

макологические и немедикаментозные схемы лечения становятся обременительными у больных с полиморбидностью, снижая приверженность к лечению [62]. Следует отметить, что большинство клинических рекомендаций по ведению больных в основном написаны так, как если бы пациенты имели одно заболевание [89]. На первый взгляд представляется логичным включать в программы комплексного лечения полиморбидного пациента все рекомендации, разработанные для каждого конкретного заболевания. Однако такой подход приводит к полипрагмазии, большим затратам времени и средств. Кроме того эффективность такого подхода необходимо доказывать в хорошо спланированных клинических испытаниях на пациентах с полиморбидностью [7]. Так, в Кокрановском систематизированном обзоре [96] анализировались 18 рандомизированных клинических испытаний комплексных вмешательств у пациентов с мультиморбидностью. В 12 исследованиях преобладающим элементом вмешательства было изменение в организации оказания медицинской помощи, как правило, посредством расширенной междисциплинарной командной работы. В шести исследованиях вмешательства были в основном ориентированы на пациента, например, вмешательства типа обучения или поддержки по телефону. В целом результаты исследования свидетельствуют о слабом или среднем размере эффекта комплексных вмешательств. Хороший эффект выявлялся в случаях направленных вмешательств на такие факторы риска, как депрессия или конкретные функциональные нарушения у больных с мультиморбидностью. Считается очевидным, что полипрагмазия и ее серьезные последствия неизбежны в случае выполнения рекомендаций всех узких специалистов по фармакотерапии полиморбидного больного [7]. В качестве примера можно привести описание лечения гипотетической 78-летней женщины с пятью хроническими заболеваниями (остеопороз, остеоартрит, СД 2 типа, артериальная гипертензия, ХОБЛ) [20]. С учетом клинических рекомендаций специалистов ей должно быть назначено до 12 отдельных препаратов, принимаемых 5 раз в течение суток. Помимо этого, пациентке будут рекомендованы еще 14 немедикаментозных вмешательств в месяц. Понятно, что исходы такого лечения трудно прогнозировать с точки зрения безопасности и эффективности. Не случайно эксперты ВОЗ считают, что «лечение каждого заболевания в отдельности – научно устаревшая стратегия». В то же время клиницистам следует опираться на результаты клинических испытаний, которые будут включать больных с полиморбидностью и проверят эффективность лечения несколькими

лекарственными препаратами или других, новых стратегий вмешательств [7]. Эти исследования необходимы для создания современных руководств по клинической практике ведения полиморбидных больных. Следует помнить, что пациенты с полиморбидностью патогенетически и фенотипически разнородны, отличаются от больных с одним заболеванием тяжестью клинических проявлений, неблагоприятным прогнозом, недостаточным ответом на терапию и высоким риском нежелательных явлений [13]. Полиморбидность обязывает врачей, ученых переходить от нынешней практики лечения одного заболевания к подходу, ориентированному на пациента [38, 64]. Полиморбидность тяжелым бременем ложится на больного, его родственников, организаторов здравоохранения, общество, и последствия этого мы пока только начинаем осознавать. Складывается впечатление, что здравоохранение оказалось не совсем готово к обслуживанию полиморбидных больных, но эта актуальная проблема требует отдельного анализа и обсуждения и выходит за рамки настоящего сообщения.

Вялотекущее системное воспаление при старении, старение иммунной системы – факторы риска полиморбидности?

В последние годы накопилось достаточно много экспериментальных и клинических данных, которые позволили предположить, что старение и полиморбидность связывают сходные молекулярные и клеточные механизмы [33, 38, 41, 42, 46, 113]. Эти механизмы объединены понятием «inflammaging/инфламэйджинг» (inflammation – воспаление и aging – старение), которое впервые было предложено группой ученых во главе с Клаудио Франчески [37, 38, 39, 40]. «Инфламэйджинг» (ИЭ) представляет собой вялотекущее хроническое системное воспаление при старении, обязательным условием для которого является отсутствие явного очага инфекции («стерильное воспаление»). По своим основным патофизиологическим характеристикам ИЭ значительно отличается от острого воспаления: оно является хроническим, слабо выраженным, протекает бессимптомно, системно и контролируется [33, 46, 47]. Напомним, что в обычных условиях воспаление затухает, когда устраняется или минимизируется действие провоспалительных патогенов и воспаление переходит в стадию разрешения, характеризующуюся регенерацией пораженной ткани и рубцеванием. Особенностью ИЭ является состояние неразрешимого воспаления, вероятно, вследствие неполной элиминации патогена или недостатка лимитирующих этот тип воспаления факторов [33, 39, 46]. Движущими силами ИЭ являются большой ансамбль клеточных элементов и не клеточных медиаторов вос-

паления, внутриклеточные посредники про- и противовоспалительных сигналов [33, 92, 113]. Базовым фактором развития возрастного ИЭ является старение системы иммунитета, обозначаемое термином “immunosenescence”, и старение эндокринной и нервной системы, которые участвуют в регуляции функции иммунитета. Кратко опишем основные механизмы ИЭ, характеристики старения иммунной системы, поскольку более подробные сведения можно получить из других обзоров [33, 39, 46, 71, 113].

ИЭ пожилых людей характеризуется повышенным уровнем в сыворотке периферической крови провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IL-18 и TNF α [21, 27]. В экспериментах на старых животных показана повышенная экспрессия мРНК IL-1 β , IL-15, IL-18, TNF α и продукция TNF α в мононуклеарах периферической крови *in vitro*, увеличение уровня перечисленных цитокинов в сыворотке ПК, и это, по мнению авторов, является отличительной чертой ИЭ [8]. Показано, что пожилой возраст неодинаково влияет на содержание внутриклеточных цитокинов профиля Th1 (IFN γ и TNF α) и Th2 (IL-4) в лимфоцитах с фенотипом CD95⁻CD28⁺, CD95⁺CD28⁺ и CD95⁺CD28⁻. Наиболее чувствительными оказались Т-клетки памяти, среди которых возрастала доля IL-4-позитивных клеток и уменьшался процент IFN γ -позитивных клеток [10]. Проспективное обследование лиц в возрасте 100 и более лет показало, что повышение уровня TNF α было прямо связано с увеличением смертельных исходов как у мужчин, так и у женщин (отношение рисков = 1,5) [21]. Содержание IL-6, IL-8, С-реактивного белка не ассоциировалось с количеством летальных случаев, деменция и сердечно-сосудистые заболевания были основными в составе полиморбидности. Оценена связь аллелей IL-10 и TNF α , которые выполняют противоположные функции при воспалении, с продолжительностью жизни [60]. Образцы ДНК получены от 72 неродственных столетних мужчин и 102 столетних женщин из Центральной и Южной Италии. Контрольная группа обследованных включала здоровых неродственных лиц (115 мужчин и 112 женщин в возрасте 22–60 лет), подобранных по географическому происхождению. Установлено значительное увеличение частоты «противовоспалительного» генотипа у мужчин-долгожителей. При исследовании частоты полиморфизмов генов IL-6, IL-10 и IFN γ у 112 долгожителей острова Сардиния (36 мужчин, 76 женщин), популяция которых имеет генетический фон, отличающийся от такового в материковой части Италии, а также у 137 лиц контрольной группы из того же географического района не было выявлено существенных различий в целом и при анализе данных по полу [85]. В 2015 г. опубликован обзор данных литературы, посвященный результатам оценки содержания про-

и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови ПК у долгожителей [71]. Авторы обзора подчеркивают противоречивость результатов исследования, которая объясняется рядом факторов. Исследуемые выборки гетерогенны, когорты участников исследования мало сопоставимы. Не всегда учитываются этнические и генетические различия, образ жизни, особенности национальной культуры и др. Тем не менее считается, что уровни IL-6, TNF α и IL-10 в сыворотке ПК могут рассматриваться как маркеры ИЭ в сыворотке ПК [33]. Какие основные причины, приводящие к ИЭ, обсуждаются в литературе?

В первую очередь, это пожизненная антигенная стимуляция, по упрощенной классификации Franceschi С., подразделяющаяся на «не-я» (постоянные инфекции), «я» (антигены фрагментов погибших клеток, нуклеиновые кислоты, гликированные белки и т.д.) и «квази-я» – антигены кишечного микробиома [39]. Немалый вклад в формирование ИЭ вносит накопление стареющих клеток, характеризующихся провоспалительным секреторным потенциалом [33, 42, 46]. По мнению ряда авторов, характеристики и количество хронической антигенной нагрузки, обуславливающей ИЭ, являются основным фактором, определяющим изменения в иммунной системе у пожилых людей, скорость старения, качество и продолжительность жизни [33, 39, 46]. Предполагается, что изменения в иммунной системе и старение будут отсрочены у тех субъектов, которые большую часть жизни жили в «чистых» условиях, позволявших свести к минимуму воздействие постоянных вирусных и паразитарных инфекций. Это именно то, что произошло в прошлом веке в экономически развитых странах мира, где медицинская помощь, вакцинация, гигиена пищевых продуктов, воды и жилья способствовали снижению антигенной нагрузки и увеличению продолжительности жизни [33, 46].

Старение и врожденный иммунитет

Ответ стареющего организма на длительную антигенную нагрузку осуществляется, в первую очередь, клетками врожденного иммунитета. Врожденный иммунитет является наиболее филогенетически консервативной защитой в животном мире, позволяющей организму в течение всей жизни эффективно справляться с большим количеством эндогенных и внешних патогенов [72]. Клетки врожденного иммунитета распознают и реагируют на молекулярные паттерны внешних и внутренних патогенов посредством специфических рецепторов, которые играют ключевую роль в устранении антигенов [46, 53, 88]. Мы не будем подробно описывать все связанные со старением изменения для каждой субпопуляции клеток врожденного иммунитета, поскольку эта проблема всесторонне рассмотрена в других сообщениях [17, 74, 99]. Напомним,

что клетки врожденного иммунитета экспрессируют три основных класса рецепторов распознавания образов (pattern recognition receptors – PRR), каждый из которых играет определенную роль в элиминации патогена, и все они участвуют в реализации воспаления. Первый класс PRR включает Toll-подобные рецепторы, которые, используя различные внутриклеточные сигнальные пути, приводят к активации NF-κB и продукции различных медиаторов, таких как цитокины и хемокины [107]. Второй класс включает NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptor), которые способны стимулировать воспалительный ответ и приводят к выработке IL-1, IL-18 и IL-33 [56]. Третий класс представлен Rig-1-подобными рецепторами (retinoic acid-inducible gene 1), которые действуют через элементы ответа на интерферон [14]. Существуют и другие рецепторы (Fcγ-рецепторы, хемокиновые рецепторы, fMLP-рецепторы, рецепторы к компонентам комплемента и др.) [44], экспрессирующиеся на клетках врожденного иммунитета и участвующие в поддержании воспаления. Так, Liu и соавт. показали, что содержание IL-6 и IL-8 увеличивается в трансфицированных RIG-I стареющих клетках. Причем нокаут RIG-I в стареющих клетках приводит к увеличению продолжительности жизни клеток. Это свидетельствует о том, что индуцированное посредством рецепции RIG-I воспаление играет значительную роль в прогрессии старения [61].

В последние годы было показано, что врожденная иммунная система обладает своего рода «памятью», которая была названа «тренированной памятью врожденного иммунитета» [55, 76]. Гипотеза о тренированной памяти частично объясняет, почему стареющие клетки врожденного иммунитета находятся в состоянии постоянной активации [46]. Эта идея получила право на жизнь после публикаций данных о том, что после инфицирования культуры моноцитов/макрофагов БЦЖ клетки через 3 месяца сохраняли «память» о первоначальной инфекции и адекватно реагировали, в отсутствие БЦЖ, на любую другую инфекцию [55]. Механизм формирования памяти, вероятно, обусловлен изменениями в эпигеноме клеток врожденного иммунитета и снижением их энергетического потенциала [38]. Кроме того, это явление в некоторой степени напоминает гормезис, поскольку стимуляция клеток низкими дозами антигена приводит к адаптивным изменениям – развитию «тренированности» иммунной системы и появлению возможности реагировать интенсивнее после каждой повторной стимуляции [24, 66], и этот феномен имеет клиническое значение. Так, в продольных исследованиях на пожилых людях-долгожителях показано наличие не только ИЭ, но и положительной связи между

уровнем воспаления и продолжительностью жизни [11, 81].

Основным внутриклеточным регулятором врожденного иммунитета является система NF-κB – древний сигнальный путь, обнаруживаемый как у насекомых, так и у позвоночных. Система NF-κB находится в узловой точке, соединяя ответ на внешние и внутренние стимулы, как при старении, так и при возрастных заболеваниях [48, 91]. Причем усиление и снижение активности NF-κB регулируются рядом сигнальных систем. Недавние исследования показали, что SIRT1 (гомолог Sir2) и FoxO (DAF-16), ключевые регуляторы старения в моделях почкующихся дрожжей и *Caenorhabditis elegans*, регулируют эффективность передачи сигналов NF-κB и уровень воспалительных реакций [91]. Напомним, что белки Silent Information Regulator (Sir) регулируют продолжительность жизни у множества модельных организмов [49]. Sir2 (SIRT1-7 у млекопитающих) является NAD-зависимой деацетилазой, участвующей в процессах старения и воспалении у дрожжей, червей и мух. SIRT1, наиболее широко изученный у млекопитающих, имеет высококонсервативный NAD-зависимый основной домен sirtuin и рассматривается как один из кандидатов-регуляторов продолжительности жизни наряду с другими шестью гомологами.

Система TOR (target of rapamycin) – высококонсервативная серин/треонин протеинкиназа, играет важную роль в регуляции роста и пролиферации клеток [95, 108]. По своим различным функциям TOR разделяют на TORC1 и TORC2, TOR регулирует ИЭ, активируя NF-κB и способствуя развитию возраст-зависимых заболеваний [100, 107]. Когда передача сигналов TOR уменьшается или инактивируется, продолжительность жизни проволочников и дрозофилы увеличивается [52]. Белки сигнального пути Notch являются универсальными регуляторами клеточного гомеостаза в эмбриогенезе и поддержании целостности тканей взрослого организма [113]. Через межклеточные взаимодействия они осуществляют контроль направления развития клеток микроокружения, их способности к пролиферации, дифференцировке, апоптозу, самообновлению. Участие Notch-сигналинга в процессах старения и воспаления осуществляется путем поляризации макрофагов в субпопуляцию M1-макрофагов при стимулирующих воздействиях, M2-макрофагов – при ингибирующих [113]. Конститутивная активация передачи сигналов Notch вызывает старение эндотелиальных клеток, усиливая экспрессию в них ряда провоспалительных цитокинов/хемокинов и молекул адгезии. Предполагается, что этот механизм лежит в основе развития некоторых сосудистых заболеваний, связанных с хроническим воспалением и старением [87].

Известно, что Ras – важные сигнальные белки с различными функциями – участвуют в передаче атерогенных стимулов, способствуют старению дрожжей и клеток первичной культуры фибробластов человека [70]. Показано, что атерогенные сигналы, опосредованные Ras, вызывают старение и воспаление в гладких мышцах сосудов, участвуя в развитии атеросклероза [70]. Авторы работы считают, что знание этого механизма патогенеза атеросклероза открывает новые возможности лечения болезни, на основе разработки препаратов, снижающих процесс старения мышечных клеток.

МикроРНК (miR) представляют собой класс молекул, участвующих в регуляции экспрессии генов и модуляции сигнальных путей, включая NF-κB, mTOR, сиртуины, TGF-β и Wnt [113]. miR контролируют воспаление, клеточное старение и течение возрастных заболеваний, их разделяют на две группы: связанные с воспалением (inflamm-miRs) и связанные со старением (SA-miRs) [79]. Циркулирующие miRs, по-видимому, являются перспективными биомаркерами основных возрастных заболеваний человека [80], некоторые miRs обнаружены в плазме и лейкоцитах у долгожителей, miR-21, miR-126 и miR-146a усиливают активность NF-κB и рассматриваются как SA-miRs и inflamm-miRs [80]. Таким образом, специфические inflamm-miRs можно рассматривать как биомаркеры ИЭ [79].

Некоторые другие механизмы персистенции ИЭ

Весомый вклад в поддержание ИЭ вносят стареющие клетки (СК) [2, 23]. Оказалось, что, секретировав множество различных медиаторов, включая цитокины, хемокины, протеазы и ростовые факторы, СК путем ауто/паракринных механизмов могут влиять на клетки микроокружения. Такой набор биологически активных молекул получил название «ассоциированного со старением секреторного фенотипа» (senescence associated secretory phenotype – SASP) клеток. Известно, что SASP опосредует участие стареющих клеток в самых разнообразных биологических процессах, включая регенерацию, ремоделирование тканей, эмбриогенез, воспаление и канцерогенез [2, 23]. Секретция начинается сразу после повреждения ДНК и продолжается в течение первых полутора суток, затем в течение 4–10 дней за счет аутокринных механизмов SASP происходит усиление секреции большинства медиаторов, что приводит к формированию «зрелого» SASP [61]. Активность SASP регулируется и на транскрипционном, и на посттранскрипционном уровнях. Ключевая роль в регуляции экспрессии компонентов SASP, включая IL-6, IL-8, CXCL1, CXCR2, отводится NF-κB [78, 90].

Существенное влияние, помимо хронического антигенного стресса, на клетки иммунной системы, другие клетки организма оказывают побочные продукты окислительного метаболизма, в основном активные формы кислорода (АФК), как следствие пожизненного респираторного выброса [33, 113]. Увеличение выработки и накопления АФК в процессе старения вызывает повреждение многих компонентов лимфоидных и антигенпрезентирующих клеток (липидных мембран, ферментов и структурных белков, нуклеиновых кислот и пр.) [31]. Уровень АФК тесно связан с продолжительностью жизни, старением и возрастными заболеваниями [32]. Считается, что нестабильность генома, вызванная окислительным повреждением, является одной из основных причин старения [50]. Повреждающему влиянию АФК противодействуют несколько генетически контролируемых, ферментативных, неферментативных систем антиоксидантной защиты, ферменты репарации ДНК и апоптоз [41]. Эти защитные механизмы с возрастом становятся все менее эффективными, и в результате клетки подвергаются своего рода адаптации к окислительному стрессу, характеризующейся накоплением стареющих и мутированных клеток, дисфункцией тканей и повышенным риском развития опухолей [32]. Помимо этого, клетки становятся устойчивыми к апоптозу, что еще больше увеличивает число стареющих и функционально измененных лимфоцитов, фагоцитирующих клеток [113]. Другой важной особенностью старения иммунной системы является снижение чувствительности к острому стрессу. Если у молодых людей стресс является мощным модулятором иммунных функций, достаточно полноценно обеспечивающим иммунный ответ, то у пожилых людей иммунный ответ при остром стрессе снижается в результате старения иммунной системы и ИЭ [22].

Старение и адаптивный иммунитет

Изменения в адаптивной иммунной системе при старении подробно описаны [33, 46, 54, 58, 102, 109, 111, 114], здесь мы коснемся лишь основополагающих сведений. Основные изменения в старении адаптивной иммунной системы происходят в компартменте Т-лимфоцитов [102, 109]. Наблюдается увеличение числа эффекторных Т-клеток и CD8⁺Т-клеток памяти [109]. CD8⁺Т-клетки памяти характеризуются потерей маркеров наивных Т-клеток – CD28, CD27 и появлением новых «стареющих маркеров», таких как KLRG1. У пожилых людей в периферической крови уменьшается содержание наивных Т-лимфоцитов, характеризующихся экспрессией маркеров CD8, CD28 и CD27, вследствие снижения их миграции из стареющего тимуса, острого и хронического антигенного стресса в течение всей

жизни и возрастной недостаточности гемопоэтических стволовых клеток [48, 83]. Еще одним последствием хронической антигенной нагрузки является феномен истощения, связанный с появлением ингибиторных рецепторов, таких как PD-1 (programmed cell death 1), CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte – associated antigen 4) [110]. Другие субпопуляции клеток адаптивной иммунной системы при старении также подвержены изменениям различной степени выраженности. Например, субпопуляция CD4⁺T-клеток претерпевает сходные с субпопуляцией CD8⁺T-клеток изменения, субпопуляции Treg, Th17 увеличиваются со старением [105]. У пожилых людей в периферической крови уменьшается количество В-лимфоцитов и их функциональные свойства, за счет снижения содержания ранних предшественников В-лимфоцитов [43, 114]. В то же время в крови нарастает число субпопуляций «возрастных» В-клеток, обладающих способностью синтезировать различные медиаторы воспаления [114]. Предполагается, что сочетание этих нарушений адаптивного иммунитета с возрастом снижает иммунный ответ на новые антигены и способствует росту инфекций, рака и хронических заболеваний у пожилых людей [45, 114]. Изменения популяции Т-лимфоцитов происходят в результате инволюции тимуса, уменьшения адекватного репертуара TCR, доли наивных Т-лимфоцитов [46]. Считается, что снижение адаптивного иммунного ответа усиливает стимуляцию врожденного иммунного ответа, что является одним из механизмов поддержания ИЭ [46]. В то же время возрастные изменения тимуса характеризуются низким потреблением энергии, которая становится доступной для других органов и систем стареющего организма. Для стареющего организма увеличение количества Т-клеток памяти может быть полезным, поскольку достигается полноценный вторичный иммунный ответ на родственные и неродственные антигены [46].

В организме человека много скрытых инфекций, которые при определенных условиях могут периодически активироваться [57]. Одним из хорошо охарактеризованных патогенов этого типа является цитомегаловирус (ЦМВ) [82, 84], который долгое время считался основной причиной возрастных иммунных изменений у пожилых людей [93]. Данные последних лет позволяют считать наличие ЦМВ-инфекции не только вредным [34, 97, 98]. Авторы рассматривают ЦМВ-инфекцию как периодическую стимуляцию, которая поддерживает устойчивый иммунный ответ к антигенам ЦМВ и способствует развитию полноценного иммунного ответа на неродственные антигены, в том числе при вакцинации [68]. Помимо этого, ЦМВ-специфические Т-клетки памяти функционально активны, и их старческий

фенотип (SASP) может участвовать в развитии ИЭ [9]. Было показано, что иммунный ответ на различные антигены ЦМВ был связан с лучшей выживаемостью пожилых людей [12]. Таким образом, увеличенное количество антиген-специфических Т-клеток памяти у пожилых людей не может рассматриваться однозначно как вредное или связанное только со старением.

Приведем несколько замечаний по поводу возрастных изменений в составе микробиоты кишечника (дисбиоз) [16, 18], поскольку эта проблема пока только обозначена и далека от решения. Уместно напомнить, что впервые эту проблему пророчески обосновал в 1907 г. наш соотечественник, лауреат Нобелевской премии Илья Ильич Мечников в своей монографии «Этюды оптимизма»: «Мы вправе утверждать, что некоторые микробы кишечной флоры могут быть вредными для здоровья: они или распространяются в организме, или отравляют его своими выделениями». Исследования, касающиеся разнообразия микробиоты у долгожителей, свидетельствуют о том, что дисбиоз не является эквивалентом ИЭ, особенно у долгожителей. Так, увеличение субдоминантных видов и среди них видов которые считаются очень «хорошими», наблюдалось у итальянских, японских и китайских долгожителей, несмотря на различия в рационе и генетике у пожилых людей, особенно у полусуперцентенариев [18, 94]. Примечательно, что у столетних жителей Испании содержание в периферической крови биомаркера кишечной проницаемости зонулина и липополисахарида грамотрицательных бактерий было меньше аналогичных показателей у молодых здоровых людей [25].

Следует помнить, что иммунная система человека не автономна и в течение всей жизни взаимодействует с нервной и эндокринной системами, и эти взаимодействия меняются в пожилом и старческом возрасте [29, 30, 46]. Анализ этой актуальной и интригующей проблемы не входит в задачу настоящего сообщения.

Итак, в процессе старения организма человека врожденная и адаптивная иммунная системы претерпевают различные структурно-функциональные изменения. Основной характеристикой старения клеток врожденной иммунной системы являются увеличение постоянной провоспалительной активности с одной стороны и недостаточный ответ на патогены, когда необходимо выполнение специфических функций, с другой стороны [46]. Предполагается, что эта дихотомия лежит в основе концепции ИЭ, согласно которой активация клеток врожденной иммунной системы у пожилых людей компенсирует возможности измененной адаптивной иммунной системы [33, 46]. Возникает вопрос: могут ли ИЭ и старение иммунной системы быть причинами многочис-

ленных возрастных изменений и болезней, им приписываемых? На этот вопрос можно было бы дать однозначные утвердительные ответы, если бы не некоторые экспериментальные и клинические данные, которые заставляют оценивать роль иммунных изменений при старении и их последствия несколько иначе. Так, считается, что увеличение доли клеток с адаптивной памятью может быть полезным для более эффективной борьбы с аутоантигенами — потенциальными факторами риска аутоиммунных заболеваний [33, 46, 113]. Инволюция тимуса рассматривается как возможность ограничения потребления энергии органом, не являющимся абсолютно необходимым для выживания, в пользу поддержания функции других жизненно важных органов, которые нуждаются в большей затрате энергии [46]. Наконец, увеличение доли Treg, наблюдаемое у пожилых людей, может препятствовать развитию аутоиммунной патологии [46, 113]. Некоторые регистрируемые изменения врожденной иммунной системы также могут быть «полезны». Например, увеличение числа клеток врожденного иммунитета с «тренированной» памятью может также помочь эффективно элиминировать повышенное содержание аутоантигенов и частично родственных патогенов [76]. ИЭ, рассматриваемое как повышенная «готовность» врожденного иммунитета к агрессии патогеном, имеет некоторые эволюционные преимущества и даже может считаться необходимым, если оно хорошо регулируется и не является чрезмерным.

Одним из клинических показателей функции иммунитета считаются результаты вакцинации. Представление о том, что у пожилых людей ИЭ, изменения в адаптивном иммунитете приводят к снижению ответа на вакцинацию, подвергается сомнению [54]. Так, в исследовании Lal и соавт. сообщается об успешном ответе на новую вакцину против опоясывающего герпеса в очень старом возрасте и это заставляет по новому оценивать роль ИЭ и старение адаптивного иммунитета в результатах вакцинации [57]. Приведем примеры, демонстрирующие эффективность иммунотерапии рака у старых людей. Показано, что у больных с метастатической меланомой применение ингибиторов контрольных точек иммунитета (молекул «чек-пойнт») увеличивало продолжительность жизни пожилых людей, как и молодых пациентов [31, 35, 51]. Эти данные свидетельствуют о том, что измененные Т-лимфоциты пожилых людей могут восстанавливать цитотоксическую противоопухолевую активность под влиянием иммунотерапии.

В то же время нет никаких сомнений в том, что старение иммунной системы и ИЭ способствуют увеличению частоты возрастных заболеваний и полиморбидности [33, 46, 113]. Мы пока очень

плохо представляем себе механизмы накопления полиморбидности с возрастом, закономерности, лежащие в основе разнообразных вариантов сочетания болезней. Так, совсем недавно опубликованы результаты метаанализа влияния остеоартрита (ОА) на снижение когнитивных функций и общую смертность у пожилых пациентов с полиморбидностью [67]. Были оценены 7 независимых выборок данных, полученных в исследованиях популяций в США, ЕС и Австралии с общим количеством профилей $> 7 \times 10^7$. Установлено, что пожилые люди с полиморбидностью и ОА характеризуются более высокой когнитивной способностью, более поздним началом деменции, увеличением продолжительности жизни и снижением возрастной смертности от всех причин, в сравнении с пациентами когорты без ОА. Кроме того, у больных полиостеоартритом, в отличие от больных с моноостеоартритом или отсутствием ОА, зарегистрировано снижение случаев смертности и деменции. Прогнозируется, что до 8-10% пациентов с полиостеоартритом достигают продолжительности жизни 100 лет, тогда как в популяции без ОА столетних регистрируется менее чем у 1% пациентов. Пытаясь объяснить эти ошеломляющие данные, авторы высказывают гипотезу о том, что ОА представляет собой «очаг асептической незаживающей раны», при которой пожизненно преобладают противовоспалительные медиаторы, способствующие продлению жизни и снижению риска когнитивных расстройств. Результаты позволяют предполагать, что некоторые заболевания из числа полиморбидных могут выполнять протективную (адаптивную) роль в отношении стареющего организма человека, а полиморбидность не есть простая сумма фенотипов и эндотипов входящих в ее состав болезней, а некое целое с эмерджентными свойствами, о которых мы пока имеем очень смутное представление.

В целом ряд исследователей [33, 39, 46, 113] считают, что вызванные старением структурно-функциональные изменения в иммунной системе делают ее более приспособленной для борьбы с патогенными микроорганизмами, аутоантигенами. Считается, что с точки зрения эволюции изменения в иммунной системе при старении направлены на оптимизацию ресурсов стареющего организма, даже если это в конечном итоге приводит к развитию болезней и смерти. Многие или большинство возрастных изменений в иммунной системе, некоторые возраст-ассоциированные болезни в составе полиморбидности могут быть желательными адаптациями к процессу старения [39]. При этом следует помнить, что популяция стареющих людей неоднородна, и люди не стареют одинаково, и лежащие в основе старения механизмы отличаются [40]. Имен-

но эти различия обуславливают разнородность в темпах старения, рисках развития заболеваний и полиморбидности, особенностей их течения и исходов. В таком случае можно говорить о «персонализации» старения и полиморбидности, которые сегодня практически не изучены. Отсюда проблемы с новыми подходами к профилактике и лечению старения и ассоциированных заболеваний у конкретного человека.

Готовы ли мы вмешиваться в ИЭ, старение иммунной системы, минимизировать риски возникновения возраст-ассоциированных заболеваний? Имеются данные об использовании для снижения уровня ИЭ разных по происхождению и структуре препаратов, которые обладают свойствами миметиков ограничения калорий и противовоспалительным действием (препараты цинка (Zn), ресвератрол, флавоноиды Epimedium total, икариин, метформин и др.) [64, 72, 73, 113]. Некоторые авторы скептически относятся к возможностям такой, плохо обоснованной, терапии. Если рассматривать ИЭ, изменения в иммунной системе, связанные со старением, как адаптацию/ремоделирование, вероятность достижения эффекта с помощью известных препаратов, разработанных по другим показаниям, слишком мала [46]. Эффективность и безопасность противовоспалительной терапии будут зависеть от уровня воспаления и его продолжительности у конкретного больного, возраста пациента, комбинации полиморбидных заболеваний, индивидуальных особенностей взаимодействий врожденной и адаптивной иммунной системы с другими стареющими гомеостатическими системами и многих других факторов. С учетом множества переменных в организме пожилого человека, обеспечивающих адаптацию и ремоделирование, мы, в очередной раз, подошли к осознанию целостности организма человека и необходимости уметь сохранять и контролировать целостность. Поэтому не случайно «золотым стандартом» вмешательств по противодействию старению и снижению риска полиморбидности являются общие (системные) вмешательства: ограничение калорий в пищевом рационе (CR), известное как диетическое ограничение (DR) и регулярные физические нагрузки [86, 101]. Показано, что CR вместе с адекватным потреблением питательных веществ увеличивает максимальную продолжительность жизни, возможно, благодаря полезным метаболическим, гормональным и функциональным изменениям [86]. Предполагается, что действие CR обусловлено главным образом его способностью подавлять связанные с окислительным стрессом нарушения, повышающие риск возрастных заболеваний [83, 113]. Установлено, что CR может модулировать многие важные воспалительные сигнальные пути, вовлеченные в старение и ИЭ:

NF-κB, mTOR и MAPK [101, 113]. Активация NF-κB, увеличение содержания в ПК IL-β, IL-6 и TNFα, как основных компонентов ИЭ, ослабляются при низкокалорийной диете [95, 102]. Подчеркивается, что в любых случаях системных вмешательств они должны быть по возможности персонализированы, с обязательной характеристикой «иммунобиографии» человека [40, 46].

Заключение

На основе положений системной биологии имеются доказательства того, что физиологическая дисрегуляция – возрастное нарушение способности сложных регуляторных сетей поддерживать гомеостаз, играет ключевую роль в процессе старении, снижая надежность и сложность системы гомеостаза [29, 81]. В этих условиях стареющая иммунная система способна адаптироваться к новым антигенным нагрузкам, используя оставшиеся резервы, однако степень адаптации, ее исходы индивидуальны [46]. Иммунная система человека, когда она функционирует полноценно, в содружестве с другими гомеостатическими системами, главным образом нервной, метаболической и эндокринной, является важнейшим участником управления здоровьем. С течением возраста, при наличии факторов риска, иммунная система большинства людей не способна адаптироваться полноценно (дезадаптация), что увеличивает риск развития болезней [83]. Процесс старения и возникновение болезни (полиморбидности) нельзя рассматривать как отдельные явления, хотя они существенно отличаются по своей природе и в то же время могут взаимодействовать [38]. Описаны различные изменения в иммунной системе с возрастом, большинство из них признаны predisposing факторами возникновения возрастных заболеваний и их комбинаций. Изменения происходят как во врожденной, так и в адаптивной иммунной системе, возможно, не в одинаковой степени и с одинаковыми последствиями. Существует сложная взаимосвязь между старением и старением иммунной системы, механизмы которых в ряде случаев почти идентичны, в других сильно отличаются, возникают совместно, взаимно влияя друг на друга. Будущие направления исследований следует сосредоточить на выяснении молекулярных и клеточных механизмов этих взаимодействий, постановки задач, нацеленных на разработку новых вмешательств, способных уменьшать вредные последствия старения и использовать полезные эффекты для сохранения здоровья и достижения максимальной продолжительности жизни. Надо надеяться, что на этом долгом пути исследований нас будут ожидать не только разочарования, но и радости.

Список литературы / References

1. Арутюнов А.Г., Драгунов Д.О., Арутюнов Г.П., Рылова А.К., Пашкевич Д.Д., Витер К.В., Деревянченко М.В., Инина Л.И., Соловьева О.Е., Стаценко М.Е. Первое открытое исследование синдрома острой декомпенсации сердечной недостаточности и сопутствующих заболеваний в Российской Федерации. Независимый регистр ОРАКУЛ-РФ // Кардиология, 2015. Т. 22, № 5. С. 12-21. [Arutyunov A.G., Dragunov D.O., Arutyunov G.P., Rylova A.K., Pashkevich D.D., Witter K.V., Derevyanchenko M.V., Inin L.I., Solovyeva O.E., Statsenko M.E. First open study of the syndrome of acute decompensation of heart failure and associated diseases in the Russian Federation. Independent register ORACLE-RF. *Kardiologiya = Cardiology*, 2015, Vol. 22, no. 5, pp. 12-21. (In Russ.)]
2. Бородкина А.В., Дерябин П.И., Грюкова А.А., Никольский Н.Н. «Социальная жизнь» стареющих клеток: что такое SASP и зачем его изучать? // Acta Naturae (Русскоязычная версия), 2018. Т. 10, № 1 (36). С. 4-15. [Borodkina A.V., Deryabin P.I., Giukova A.A., Nikolsky N.N. "Social life" of senescent cells: what is SASP and why study it? *Acta Naturae (Russian version)*, 2018, Vol. 10, no. 1 (36), pp. 4-15. (In Russ.)]
3. Воронин С.В., Черкашин Д.В., Бершева И.В. Полиморбидность: определение, классификация, распространенность, методы оценки и практическое значение // Вестник российской военно-медицинской академии, 2018. № 4 (64). С. 243-248. [Voronin S.V., Cherkashin D.V., Bersheva I.V. Polymorbidity: definition, classification, prevalence, methods of assessment and practical significance. *Vestnik rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2018, no. 4 (64), pp. 243-248. (In Russ.)]
4. Насонов Е.Л., Гордеев А.В., Галушко Е.А. Ревматические заболевания и multimorbidity // Терапевтический архив (архив до 2018 г.), 2015. № 87 (5). С. 4-9. [Nasonov E.L., Gordeev A.V., Galushko E.A. Rheumatic diseases and multimorbidity. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2015, no. 87 (5), pp. 4-9. (In Russ.)]
5. Нургазизова А.К. Происхождение, развитие и современная трактовка понятий «коморбидность» и «polymorbidity» // Казанский медицинский журнал, 2014. Т. 95, № 2. С. 292-296. [Nurgazizova A.K. The origin, development and current concepts of "comorbidity" and "polymorbidity". *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2014, Vol. 95, no. 2, pp. 292-296. (In Russ.)]
6. Пузырев В.П. Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии человека // Медицинская генетика, 2008. № 9. С. 3-9. [Puzyrev V.P. Genetic view on the phenomenon of combined pathology in human. *Meditsinskaya genetika = Medical Genetics*, 2008, no. 9, pp. 3-9. (In Russ.)]
7. Тарловская Е.И. Коморбидность и полиморбидность – современная трактовка и насущные задачи, стоящие перед терапевтическим сообществом // Кардиология, 2018. № 58 (9S). С. 29-38. [Tarlovskaya E.I. Comorbidity and polymorbidity – a modern interpretation and urgent tasks facing the therapeutic community. *Kardiologiya = Cardiology*, 2018, no. 58 (9S), pp. 29-38. (In Russ.)]
8. Adams A.A., Breathnach C.C., Katepalli M.P., Kohler K., Horohov D.W. Advanced age in horses affects divisional history of T cells and inflammatory cytokine production. *Mech. Ageing Dev.*, 2008, Vol. 129, no. 11, pp. 656-664.
9. Akbar A.N., Henson S.M., Lanna A. Senescence of T lymphocytes: implications for enhancing human immunity. *Trends Immunol.*, 2016, Vol. 37, no. 12, pp. 866-876.
10. Alberti S., Cevenini E., Ostan R., Capri A., Salvioli S., Bucci L., Ginaldi L., De Martinis M., Franceschi C., Monti D. Age-dependent modifications of Type 1 and Type 2 cytokines within virgin and memory CD4⁺ T cells in humans. *Mech. Ageing Dev.*, 2006, Vol. 127, no. 6, pp. 560-566.
11. Arai Y., Martin-Ruiz C.M., Takayama M., Abe Y., Takebayashi T., Koyasu S., Suematsu M., Hirose N., von Zglinicki T. Inflammation, but not telomere length, predicts successful ageing at extreme old age: a longitudinal study of semi-supercentenarians. *EBioMedicine*, 2015, Vol. 2, no. 10, pp. 1549-1558.
12. Bajwa M., Vita S., Vescovini R., Larsen M., Sansoni P., Terrazzini N., Caserta S., Thomas D., Davies K.A., Smith H., Kern F. CMV-specific T-cell responses at older ages: broad responses with a large central memory component may be key to long-term survival. *J. Infect. Dis.*, 2017, Vol. 215, no. 8, pp. 1212-1220.
13. Balandina Y., Simonova Z., Tarlovskaya Y. Comparison of combined therapy of cad accompanied by gastroduodenal pathology. *Atherosclerosis*, 2016, Vol. 252, e17. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.286.
14. Barik S. What really rigs up RIG-I? *J. Innate Immun.*, 2016, Vol. 8, no. 5, pp. 429-436.
15. Barnett K., Mercer S.W., Norbury M. Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study. *Lancet*, 2012, Vol. 380, pp. 37-43.
16. Bauer M.E., Fuente Mde L. The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mech. Ageing Dev.*, 2016, Vol. 158, pp. 27-37.
17. Bektas A., Schurman S.H., Sen R., Ferrucci L. Human T cell immunosenescence and inflammation in aging. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, Vol. 102, no. 4, pp. 977-988.
18. Biagi E., Candela M., Fairweather-Tait S., Franceschi C., Brigidi P. Aging of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age (Dordr.)*, 2012, Vol. 34, no. 1, pp. 247-267.
19. Booth H.P., Prevost A.T., Gulliford M.C. Impact of body mass index on prevalence of multimorbidity in primary care: Cohort study. *Fam. Pract.*, 2014, Vol. 31, pp. 38-43.
20. Boyd C.M., Darer J., Boult C. Clinical practice guidelines and quality of care for older patients. *JAMA*, 2005, Vol. 294, pp. 716-724.

21. Bruunsgaard H., Andersen-Ranberg K., Hjelmberg J.V.B., Pedersen B.K., Jeune B. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am. J. Med.*, 2003, Vol. 115, no. 4, pp. 278-283.
22. Butcher S.K., Lord J.M. Stress responses and innate immunity: aging as a contributory factor. *Aging Cell*, 2004, Vol. 3, no. 4, pp. 151-160.
23. Byun H.O., Lee Y.K., Kim J.M., Yoon G. From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. *BMB Rep.*, 2015, Vol. 48, no. 10, pp. 549-558.
24. Calabrese E.J., Dhawan G., Kapoor R., Iavicoli I., Calabrese V. What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity? *Biogerontology*, 2015, Vol. 16, no. 6, pp. 693-707.
25. Carrera-Bastos P., Picazo Ó., Fontes-Villalba M., Pareja-Galeano H., Lindeberg S., Martínez-Selles M., Lucia A. Serum zonulin and endotoxin levels in exceptional longevity versus precocious myocardial infarction. *Aging Dis.*, 2018, Vol. 9, no. 2, pp. 317-321.
26. Cassell A., Edwards D., Harshfield A., Rhodes K., Brimicombe J., Payne R., Griffin S. The epidemiology of multimorbidity in primary care: a retrospective cohort study. *Br. J. Gen. Pract.*, 2018, no. 4, pp. 245-251.
27. Cesari M., Penninx B.W., Pahor M., Lauretani F., Corsi A.M., Rhys W.G., Guralnik J.M., Ferrucci L. Inflammatory markers and physical performance in older persons: the InCHIANTI study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2004, Vol. 59, no. 3, pp. 242-248.
28. Cimarras-Otal C., Calderon-Larranaga A., Poblador-Plou B., Gonzalez-Rubio F., Gimeno-Feliu L.A., Arjol-Serrano J.L., Prados-Torres A. Association between physical activity, multimorbidity, self-rated health and functional limitation in the Spanish population. *BMC Public Health*, 2014, Vol. 14, pp. 1170-1176.
29. Cohen A.A., Milot E., Li Q., Bergeron P., Poirier R., Dusseault-Bélanger F., Fülöp T., Leroux M., Legault V., Metter E.J., Fried L.P., Ferrucci L. Detection of a novel, integrative aging process suggests complex physiological integration. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 3, e0116489. doi:10.1371/journal.pone.0116489.
30. Cohen A.A. Complex systems dynamics in aging: new evidence, continuing questions. *Biogerontology*, 2016, Vol. 17, no. 1, pp. 205-220.
31. Daste A., Domblides C., Gross-Goupil M., Chakiba C., Quivy A., Cochin V., Ide Mones E., Larmonier N., Soubeyran P., Ravaud A. Immune checkpoint inhibitors and elderly people: a review. *Eur. J. Cancer*, 2017, Vol. 82, pp. 155-166.
32. de la Fuente M., Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxiiinflamm-aging. *Curr. Pharm. Des.*, 2009, Vol. 15, no. 26, pp. 3003-3026.
33. de Martinis M., Franceschi C., Monti D., Ginaldi L. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of aging rate and longevity. *FEBS Letters*, 2005, Vol. 579, no. 10, pp. 2035-2039.
34. Derhovanessian E., Maier A.B., Hähnel K., Zelba H., de Craen A.J., Roelofs H., Slagboom E.P., Westendorp R.G., Pawelec G. Lower proportion of naïve peripheral CD8⁺ T cells and an unopposed pro-inflammatory response to human Cytomegalovirus proteins *in vitro* are associated with longer survival in very elderly people. *Age (Dordr.)*, 2013, Vol. 35, no. 4, pp. 1387-1399.
35. Elias R., Karantanos T., Sira E., Hartshorn K.L. Immunotherapy comes of age: immune aging & checkpoint inhibitors. *J. Geriatr. Oncol.*, 2017, Vol. 8, pp. 229-235.
36. Fabbri E., Zoli M., Gonzalez-Freire M., Salive M.E., Studenski S.A., Ferrucci L. Aging and multimorbidity: new tasks, priorities, and frontiers for integrated gerontological and clinical research. *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, 2015, Vol. 16, no. 8, pp. 640-647.
37. Feinstein A. The pre/therapeutic classification of co/morbidity in chronic disease. *J. Chron. Dis.*, 1970, Vol. 23, pp. 455-469.
38. Franceschi C., Morsiani C., Conte M., Santoro A., Grignolio A., Monti D., Capri M., Salvioli S. The continuum of aging and age-related diseases: common mechanisms but different rates. *Front. Med.*, 2018, Vol. 5, 61. doi: 10.3389/fmed.2018.00061.
39. Franceschi C., Garagnani P., Parini P., Giuliani C., Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2018, Vol. 14, pp. 576-590.
40. Franceschi C., Salvioli S., Garagnani P., de Eguileor M., Monti D., Capri M. Immunobiography and the heterogeneity of immune responses in the elderly: a focus on inflammaging and trained immunity. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 982. doi:10.3389/fimmu.2017.00982.
41. Franceschi C. Continuous remodeling as a key to aging and survival. *Biogerontology*, 2003, Vol. 4, pp. 329-334.
42. Franceschi C., Valensin S., Bonafè M., Paolisso G., Yashin A.I., Monti D., de Benedictis G. The network and the remodeling theories of aging: Historical background and new perspectives. *Exp. Gerontol.*, 2000, Vol. 35, no. 6-7, pp. 879-896.
43. Frasca D., Diaz A., Romero M., Blomberg B.B. The generation of memory B cells is maintained, but the antibody response is not, in the elderly after repeated influenza immunizations. *Vaccine*, 2016, Vol. 34, no. 25, pp. 2834-2840.
44. Fülöp T. Jr, Fóris G., Wórum I., Leövey A. Age-dependent alterations of Fc gamma receptor-mediated effector functions of human polymorphonuclear leucocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 1985, Vol. 61, no. 2, pp. 425-432.
45. Fülöp T., Dupuis G., Witkowski J.M., Larbi A. The role of immunosenescence in the development of age-related diseases. *Rev. Invest. Clin.*, 2016, Vol. 68, no. 2, pp. 84-91.

46. Fulop T., Larbi A., Dupuis G., le Page A., Frost E.H., Cohen A.A., Witkowski J.M., Franceschi C. Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: friends or foes? *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 8, 1960. doi: 10.3389/fimmu.2017.01960.
47. Giunta S. Is inflammaging an auto[innate]immunity subclinical syndrome? *Immun. Ageing*, 2006, Vol. 3, 12. doi: 10.1186/1742-4933-3-12.
48. Goronzy J.J., Fang F., Cavanagh M.M., Qi Q., Weyand C.M. Naïve T cell maintenance and function in human ageing. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, pp. 4073-4080.
49. Haigis M.C., Guarente L.P. Mammalian sirtuins – emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.*, 2006, Vol. 20, no. 21, pp. 2913-2921.
50. Hasty P., Campisi J., Hoeijmakers J., van Steeg H., Vijg J. Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? *Science*, 2003, Vol. 299, pp. 1355-1359.
51. Hurez V., Padrón Á.S., Svatek R.S., Curiel T.J. Considerations for successful cancer immunotherapy in aged hosts. *Clin. Exp. Immunol.*, 2017, Vol. 187, no. 1, pp. 53-63.
52. Kapahi P., Zid B., Harper T., Koslover D., Sapin V., Benzer S. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr. Biol.*, 2004, Vol. 14, no. 10, pp. 885-890.
53. Kaufmann S.H., Dorhoi A. Molecular determinants in phagocyte-bacteria interactions. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 3, pp. 476-491.
54. Kim C., Fang F., Weyand C.M., Goronzy J.J. The life cycle of a T cell after vaccination – where does immune ageing strike? *Clin. Exp. Immunol.*, 2017, Vol. 187, no. 1, pp. 71-81.
55. Kleinnijenhuis J., Quintin J., Preijers F., Joosten L.A., Ifrim D.C., Saeed S., Jacobs C., van Loenhout J., de Jong D., Stunnenberg H., Xavier R., Jos W., van der Meer S., van Crevel R., Netea M. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, pp. 17537-17542.
56. Kufer T.A., Nigro G., Sansonetti P.J. Multifaceted functions of NOD-like receptor proteins in myeloid cells at the intersection of innate and adaptive immunity. *Microbiol. Spectr.*, 2016, Vol. 4, no. 4, pp. 429-436.
57. Lal H., Cunningham A.L., Godeaux O., Chlibek R., Diez-Domingo J., Hwang S.J., Levin M.J., McElhaney J.E., Poder A., Puig-Barberà J., Vesikari T., Watanabe D., Weckx L., Zahaf T., Heineman T.C. Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults. *N. Engl. J. Med.*, 2015, Vol. 372, no. 22, pp. 2087-2096.
58. Larbi A., Fulop T. From “truly naïve” to “exhausted senescent” T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A*, 2014, Vol. 85, no. 1, pp. 25-35.
59. le Reste J.Y., Nabbe P., Mancau B. The European General Practice Research Network presents a comprehensive definition of multimorbidity in family medicine and long term care, following a systematic review of relevant literature. *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, 2013, Vol. 14, pp. 319-325.
60. Lio D., Scola L., Crivello A., Colonna-Romano G., Candore G., Bonafé M., Cavallone L., Marchegiani F., Olivieri F., Franceschi C., Caruso C. Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10-1082 promoter SNP and its interaction with TNF- α -308 promoter SNP. *J. Med. Genet.*, 2003, Vol. 40, no. 4, pp. 296-299.
61. Liu F., Wu S., Ren H., Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat. Cell Biol.*, 2011, Vol. 13, no. 3, pp. 254-262.
62. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2016 Sep. Clinical guidelines. Multimorbidity: assessment, prioritisation and management of care for people with commonly occurring multimorbidity. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK385543/>.
63. Malaquin N., Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence – associated secretory phenotype. *Exp. Gerontol.*, 2016, Vol. 82, pp. 39-49.
64. Marchal J., Pifferi E., Aujard F. Resveratrol in mammals: effects on aging biomarkers, age-related diseases, and life span. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2013, Vol. 1290, no. 1, pp. 67-73.
65. Marengoni A., Angleman S., Melis R., Mangialasche F., Karp A., Garmen A., Meinow B., Fratiglioni L. Aging with multimorbidity: A systematic review of the literature. *Ageing Res. Rev.*, 2011, Vol. 10, no. 4, pp. 430-439.
66. Martucci M., Ostan R., Biondi F., Bellavista E., Fabbri C., Bertarelli C., Salvioli S., Capri M., Franceschi C., Santoro A. Mediterranean diet and inflammaging within the hormesis paradigm. *Nutr. Rev.*, 2017, Vol. 75, no. 6, pp. 442-455.
67. Mayburd A.L., Baranova A. Increased lifespan, decreased mortality, and delayed cognitive decline in osteoarthritis. *Sci Rep.*, 2019, Vol. 9, no. 1, 18639. doi: 10.1038/s41598-019-54867-8.
68. McElhaney J.E., Garneau H., Camous X., Dupuis G., Pawelec G., Baehl S., Tessier D., Frost E., Frasca D., Larbi A., Fulop T. Predictors of the antibody response to influenza vaccination in older adults with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res. Care*, 2015, Vol. 3, no. 1, e000140. doi:10.1136/bmjdr-2015-000140.
69. McPhail S.M. Multimorbidity in chronic disease: impact on health care resources and costs. *Risk Manag. Healthc. Policy.*, 2016, Vol. 9, pp. 143-156.
70. Minamino T., Yoshida T., Tateno K., Miyachi H., Zou Y, Toko H, Issei Komuro I. Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation*, 2003, Vol. 108, no. 18, pp. 2264-2269.

71. Minciullo P.L., Catalano A., Mandraffino G., Crucitti M.A., Maltese G., Morabito N., Lasco A., Gangemi S., Basile G. Inflammaging and anti-inflammaging: the role of cytokines in extreme longevity. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2015, Vol. 64, no. 2, pp. 111-126.
72. Mocchegiani E., Costarelli L., Giacconi R., Cipriano C., Muti E., Tesi S., Malavolta M. Nutrient-gene interaction in ageing and successful ageing. A single nutrient (zinc) and some target genes related to inflammatory/immune response. *Mech. Ageing Dev.*, 2006, Vol. 127, no. 6, pp. 517-525.
73. Moiseeva O., Deschênes-Simard X., St-Germain E., Igelmann S., Huot G., Cadar A.E., Bourdeau V., Pollak M.N., Ferbeyre G. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell*, 2013, Vol. 12, no. 3, pp. 489-498.
74. Molony R.D., Malawista A., Montgomery R.R. Reduced dynamic range of antiviral innate immune responses in aging. *Exp. Gerontol.*, 2018, Vol. 107, pp. 130-135.
75. Müller L., Fülöp T., Pawelec G. Immunosenescence in vertebrates and invertebrates. *Immun. Ageing*, 2013, Vol. 10, no. 1, 12. doi:10.1186/1742-4933-10-12.
76. Netea M.G., van der Meer J.W. Trained immunity: an ancient way of remembering. *Cell Host Microbe*, 2017, Vol. 21, no. 3, pp. 297-300.
77. Nunes B.P., Flores T.R., Mielke G.I., Thume E., Facchini L.A. Multimorbidity and mortality in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 2016, Vol. 67, pp. 130-138.
78. Ohanna M., Giuliano S., Bonet C. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev.*, 2011, Vol. 25, no. 12, pp. 1245-1261.
79. Olivieri F., Rippo M.R., Procopio A.D., Fazioli F. Circulating inflamma-miRs in aging and age-related disease. *Front. Genet.*, 2013, Vol. 4, 121. doi: 10.3389/fgene.2013.00121.
80. Olivieri F., Rippo M.R., Monsurrò V., Salvioli S., Capri M., Procopio A.D., Franceschi C. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. *Ageing Res. Rev.*, 2013, Vol. 12, no. 4, pp. 1056-1068.
81. Ostan R., Bucci L., Capri M., Salvioli S., Scurti M., Pini E., Monti D., Franceschi C. Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. *Neuroimmunomodulation*, 2008, Vol. 15, no. 4-6, pp. 224-240.
82. Pawelec G., McElhaney J.E., Aiello A.E., Derhovanessian E. The impact of CMV infection on survival in older humans. *Curr. Opin. Immunol.*, 2012, Vol. 24, pp. 507-511.
83. Pawelec G. Hallmarks of human "immunosenescence": adaptation or dysregulation? *Immun. Ageing*, 2012, Vol. 9, 15. doi:10.1186/1742-4933-9-15.
84. Pawelec G. Immunosenescence: role of cytomegalovirus. *Exp. Gerontol.*, 2014, Vol. 54, pp. 1-5.
85. Pes G.M., Lio D., Carru C., Baggio G., Franceschi C., Ferrucci L., Oliveri F., Scola L., Crivello A., Candore G., Colonna-Romano G. Association between longevity and cytokine gene polymorphisms. A study in Sardinian centenarians. *Aging Clin. Exp. Res.*, 2004, Vol. 16, no. 3, pp. 244-248.
86. Quach A., Levine M.E., Tanaka T., Lu A.T., Chen B.H., Ferrucci L., Ritz B., Bandinelli S., Neuhaus M.L., Beasley J.M., Snetelaar L., Wallace R.B., Tsao P.S., Absher D., Assimes T.L., Stewart J.D., Li Y., Hou L., Baccarelli A.A., Whitel E.A., Horvath S. Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors. *Aging (Albany NY)*, 2017, Vol. 9, no. 2, pp. 419-446.
87. Quillard T., Charreau B. Impact of Notch signaling on inflammatory responses in cardiovascular disorders. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, Vol. 14, no. 4, pp. 6863-6888.
88. Rivera A., Siracusa M.C., Yap G.S., Gause W.C. Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. *Nat. Immunol.*, 2016, Vol. 17, no. 4, pp. 356-363.
89. Rochon P.A., Gurwitz J.H. Optimising drug treatment for elderly people: the prescribing cascade. *BMJ*, 1997, Vol. 315, no. 7115, pp. 1096-1099.
90. Rovillain E., Mansfield L., Caetano C. Activation of nuclear factor-kappa B signalling promotes cellular senescence. *Oncogene*, 2011, Vol. 30, pp. 2356-2366.
91. Salminen A., Huuskonen J., Ojala J., Kauppinen A., Kaarniranta K., Suuronen T. Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res. Rev.*, 2008, Vol. 7, no. 2, pp. 83-105.
92. Salvioli S., Capri M., Valensin S., Tieri P., Monti D., Ottaviani E., Franceschi C. Inflamm-aging, cytokines and aging: state of the art, new hypotheses on the role of mitochondria and new perspectives from systems biology. *Curr. Pharm. Des.*, 2006, Vol. 12, no. 24, pp. 3161-3171.
93. Sansoni P., Vescovini R., Fagnoni F.F., Akbar A., Arens R., Chiu Y.L., Čičin-Šain L., Dechanet-Merville J., Derhovanessian E., Ferrando-Martinez S., Franceschi C., Frasca D., Fulöp T., Furman D., Gkrania-Klotsas E., Goodrum F., Grubeck-Loebenstein B., Hurme M., Kern F., Lilleri D., López-Botet M., Maier A.B., Marandu T., Marchant A., Matheï C., Moss P., Muntasell A., Remmerswaal E.B., Riddell N.E., Rothe K., Sauce D., Shin E.C., Simanek A.M., Smithey M.J., Söderberg-Nauclér C., Solana R., Thomas P.G., van Lier R., Pawelec G., Nikolich-Zugich J. New advances in CMV and immunosenescence. *Exp. Gerontol.*, 2014, Vol. 55, pp. 54-62.
94. Santoro A., Ostan R., Candela M., Biagi E., Brigidi P., Capri M., Franceschi C. Gut microbiota changes in the extreme decades of human life: a focus on centenarians. *Cell Mol. Life Sci.*, 2017, Vol. 75, no. 1, pp. 129-148.
95. Schieke S.M., Finkel T. TOR and aging: less is more. *Cell Metab.*, 2007, Vol. 5, no. 4, pp. 233-235.
96. Smith S.M., Wallace E., O'Dowd T., Fortin M. Interventions for improving outcomes in patients with multimorbidity in primary care and community settings. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2016, Vol. 3, CD006560. doi: 10.1002/14651858.CD006560.pub3.

97. Söderberg-Nauclér C., Fornara O., Rahbar A. Cytomegalovirus driven immunosenescence—an immune phenotype with or without clinical impact? *Mech. Ageing Dev.*, 2016, Vol. 158, pp. 3-13.
98. Solana R., Tarazona R., Aiello A.E., Akbar A.N., Appay V., Beswick M., Bosch J., Campos C., Cantisán S., Cicin-Sain L., Derhovanessian E., Ferrando-Martínez S., Frasca D., Fulöp T., Govind S., Grubeck-Loebenstein B., Hill A., Hurme M., Kern F., Larbi A. CMV and immunosenescence: from basics to clinics. *Immun. Ageing*, 2012, Vol. 9, no. 1, 23. doi: 10.1186/1742-4933-9-23.
99. Solana R., Tarazona R., Gayoso I., Lesur O., Dupuis G., Fulop T. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin. Immunol.*, 2012, Vol. 24, pp. 331-341.
100. Stanfel M.N., Shamieh L.S., Kaerberlein M., Kennedy B.K. The TOR pathway comes of age. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, Vol. 1790, no. 10, pp. 1067-1074.
101. Szarc vel Szc K.S., Declerck K., Vidaković M., Berghe W.V. From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition? *Clin. Epigenetics*, 2015, Vol. 7, no. 1, 33. doi: 10.1186/s13148-015-0068-2.
102. Tu W., Rao S. Mechanisms underlying T cell immunosenescence: aging and cytomegalovirus infection. *Front. Microbiol.*, 2016, Vol. 7, 2111. doi: 10.3389/fmicb.2016.02111.
103. van den Akker M., Buntinx F., Metsemakers J.F., Roos S., Knottnerus J.A. Multimorbidity in general practice: prevalence, incidence, and determinants of co-occurring chronic and recurrent diseases. *J. Clin. Epidemiol.*, 1998, Vol. 51, pp. 67-75.
104. van den Bussche H., Schön G., Kolonko T., Hansen H., Wegscheider K., Glaeske G., Koller D. Patterns of ambulatory medical care utilization in elderly patients with special reference to chronic diseases and multimorbidity – results from a claims data based observational study in Germany. *BMC Geriatr.*, 2011, Vol. 11, 58. doi: 10.1186/1471-2318-11-54.
105. van der Geest K.S., Abdulahad W.H., Tete S.M., Lorencetti P.G., Horst G., Bos N.A., Kroesen B.J., Brouwer E., Boots A.M. Aging disturbs the balance between effector and regulatory CD4⁺ T cells. *Exp. Gerontol.*, 2014, Vol. 60, pp. 190-196.
106. van Oostrom S.H., Picavet H.S., van Gelder B.M., Lemmens L.C., Hoeymans N., van Dijk C.E., Verheij R.A., Schellevis F.G., Baan C.A. Multimorbidity and comorbidity in the Dutch population – data from general practices. *BMC Public Health*, 2012, Vol. 12, 715. doi: 10.1186/1471-2458-12-715.
107. Vidya M.K., Kumar V.G., Sejian V., Bagath M., Krishnan G., Bhatta R. Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 13, pp. 1-17.
108. Wang X., Proud C. G. mTORC1 signaling: what we still don't know. *J. Mol. Cell Biol.*, 2011, Vol. 3, no. 4, pp. 206-220.
109. Weltevrede M., Eilers R., de Melker H.E., van Baarle D. Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: a systematic review. *Exp. Gerontol.*, 2016, Vol. 77, pp. 87-95.
110. Weyand C.M., Goronzy J.J. Aging of the immune system. Mechanisms and therapeutic targets. *Ann. Am. Thorac. Soc.*, 2016, Vol. 13, pp. 422-428.
111. Wherry E.J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no. 8, pp. 486-499.
112. Willadsen T.G. Multimorbidity and mortality: A 15-year longitudinal registry-based nationwide Danish population study. *J. Comorbidity*, 2018, Vol. 8, no. 1, 2235042X18804063. doi: 10.1177/2235042X18804063.
113. Xia S., Zhang X., Zheng S., Khanabdali R., Kalionis B., Wu J., Wan W., Tai Xiantao. An Update on inflammaging: mechanisms, prevention, and treatment. *J. Immunol. Res.*, 2016, Vol. 1, pp. 1-12.
114. Yanes R.E., Gustafson C.E., Weyand C.M., Goronzy J.J. Lymphocyte generation and population homeostasis throughout life. *Semin. Hematol.*, 2017, Vol. 54, pp. 33-38.

Авторы:

Ширинский В.С. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Ширинский И.В. — д.м.н., врач-ревматолог, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shirinsky V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shirinsky I.V., PhD, MD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Leading Research Associate, Head, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 30.04.2020

Отправлена на доработку 06.05.2020

Принята к печати 08.05.2020

Received 30.04.2020

Revision received 06.05.2020

Accepted 08.05.2020

ПРОДУКЦИЯ ФАКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ФИБРОЗА, РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА

Максимова А.А., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

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

Резюме. Макрофаги (Мф) играют ключевую роль в регуляции процессов фиброгенеза, включая пролиферацию фибробластов и миофибробластов, дифференцировку клеток-предшественников в миофибробласты, а также синтез и секрецию компонентов внеклеточного матрикса, преимущественно коллагена. Направленность эффектов Мф (стимуляция или подавление) определяется рядом факторов, в том числе стадией фибротического процесса и функциональным фенотипом Мф, который зависит от сигналов микроокружения. Один из возможных путей регуляции фиброгенеза заключается в секреции Мф про- или антифиброгенных факторов, включая матриксные металлопротеиназы, ингибиторы металлопротеиназ и некоторые цитокины. Однако данные о способности различных субпопуляций Мф человека секретировать эти факторы крайне немногочисленны и противоречивы. Целью настоящего исследования была характеристика способности М1, М2а и М2с Мф человека, дифференцированных в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, продуцировать матриксные металлопротеиназы (ММР-9) и их тканевые ингибиторы (ТИМР-1), а также некоторые цитокины и ростовые факторы. Показано, что по сравнению с М2-макрофагами, М1 Мф, поляризованные липополисахаридом, продуцировали значительно больше TNF α , IL-6 и IL-2, которые, помимо провоспалительной активности, обладают, как было показано, способностью инициировать фибротический процесс. В свою очередь, М2а Мф, индуцированные IL-4, характеризовались высоким уровнем продукции VEGF и при этом низким уровнем TNF α и IL-6, что может обуславливать важное участие этих клеток на пролиферативной стадии фиброза и стимулировать активное отложение внеклеточного матрикса. И наконец, М2с Мф, поляризованные в присутствии дексаметазона, характеризовались схожим с М2а Мф спектром исследуемых цитокинов и активно продуцировали VEGF на фоне низкой продукции TNF α и IL-6. При этом все три исследуемые субпопуляции Мф активно секретировали ММР-9 и ТИМР-1, не различаясь значительно между собой по уровню продукции этих факторов. Однако М2с Мф отличались значительно более высоким индексом соотношения ММР-9/ТИМР-1 по сравнению с М1 и М2а Мф, что играет решающее значение на стадии реорганизации фибротического процесса. Таким образом, продукция различными типами Мф ММР-9 и ТИМР-1, в совокупности с другими плейотропными цитокинами и ростовыми факторами, может отражать их роль в регуляции различных стадий фибротического процесса.

Ключевые слова: макрофаги, поляризация макрофагов, цитокины, матриксные металлопротеиназы, ингибиторы матриксных металлопротеиназ, фиброз

Адрес для переписки:

Максимова Александра Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-26-74.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: parkinson.dses@gmail.com

Address for correspondence:

Maksimova Aleksandra A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-26-74.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: parkinson.dses@gmail.com

Образец цитирования:

А.А. Максимова, Е.Я. Шевела, Л.В. Сахно,
А.А. Останин, Е.Р. Черных «Продукция факторов,
участвующих в регуляции фиброза, различными типами
макрофагов человека» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 4. С. 625-632.
doi: 10.15789/1563-0625-POF-1954
© Максимова А.А. и соавт., 2020

For citation:

A.A. Maksimova, E.Ya. Shevela, L.V. Sakhno, A.A. Ostanin,
E.R. Chernykh "Production of factors involved into fibrosis
regulation by various types of human macrophages", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 4, pp. 625-632.
doi: 10.15789/1563-0625-POF-1954
DOI: 10.15789/1563-0625-POF-1954

PRODUCTION OF FACTORS INVOLVED INTO FIBROSIS REGULATION BY VARIOUS TYPES OF HUMAN MACROPHAGES

Maksimova A.A., Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Ostanin A.A.,
Chernykh E.R.

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

Abstract. Macrophages (M ϕ) play a key role in regulation of fibrogenesis, including proliferation of fibroblasts and myofibroblasts, differentiation of progenitor cells into myofibroblasts, as well as synthesis and secretion of the extracellular matrix, mainly collagen. The direction of the M ϕ effects (stimulation or suppression) is determined by a number of factors, including the stage of the fibrotic process and the M ϕ functional phenotype dependent on the signals of microenvironment. One of the feasible ways of the fibrogenesis regulating is the secretion of pro- or antifibrotic factors such as matrix metalloproteinases, inhibitors of metalloproteinases and some cytokines. However, existing data on ability to secrete these factors by various subpopulations of human M ϕ are rare and controversial. The aim of this study was to characterize the ability of human M1, M2a, and M2c M ϕ differentiating in the presence of GM-CSF to produce matrix metalloproteinases (MMP-9) and their tissue inhibitors (TIMP-1), as well as some cytokines and growth factors. As compared to M2 macrophages, the M1 macrophages polarized by lipopolysaccharide produced significantly more TNF α , IL-6 and IL-2 that have pro-inflammatory activity and are able to initiate a fibrotic process. In turn, M2a M ϕ stimulated by IL-4 were characterized by a high level of VEGF production and, at the same time, low levels of TNF α and IL-6, which may determine the important role of these cells at the proliferative stage of fibrosis and stimulation of extracellular matrix deposition. Finally, M2c M ϕ polarized by dexamethasone, exhibited the M2a-like cytokine profile, i.e., VEGF was actively produced against the background of low TNF α and IL-6 synthesis. Moreover, all three M ϕ subpopulations did actively secrete MMP-9 and TIMP-1, without significant difference in production of these factors. However, M2c M ϕ differed by a significantly higher MMP-9/TIMP-1 ratio index compared to M1 and M2a M ϕ , and it is crucial at the rearrangement stage of the fibrotic process. Thus, the production of MMP-9 and TIMP-1, together with other pleiotropic cytokines and growth factors by various M ϕ subtypes may reflect their role in regulation of fibrotic process at various stages.

Keywords: macrophages, polarization, cytokines, matrix metalloproteinases, inhibitors of matrix metalloproteinases, fibrosis

Введение

Макрофаги (M ϕ) представляют гетерогенную популяцию клеток врожденного иммунитета, которые играют ключевую роль в поддержании гомеостаза тканей. В соответствии с потребностями и под влиянием факторов окружающей среды M ϕ дифференцируются в различные функциональные фенотипы, наиболее изученными представителями которых являются M1- и M2-макрофаги. Отличительной чертой M1-макрофагов является наличие провоспалительной активности, в то время как M2-клетки проявляют противовоспалительные свойства. M2 M ϕ играют важную роль в разрешении воспаления и стимуляции репаративных процессов и могут индуцироваться под действием различных факторов – IL-4/IL-13, иммуносупрессивных цитокинов (IL-10, TGF- β), иммунных комплексов, а также ряда гормонов и витаминов (дексаметазон и витамин D3). Важно, что в действительности спектр фенотипов M ϕ чрезвычайно широк, и внутри группы M2-макрофагов выделяют как минимум M2a, M2b, M2c и M2d подтипы [8, 24]. Характерными поверхностными маркерами для M1 являются CD68, CD86, CD80, CD14, MHCII, IL-1R. В свою очередь,

для M2a такими маркерами являются маннозный рецептор (CD206), CD200R, DecoyR (CD209), CD163, IL-1RII, MHCII. M2b-макрофаги характеризуются высоким уровнем экспрессии CD86 и MHCII. Для M2c-клеток наиболее часто указываются CD163, CD206 и CD150, а также иногда SRA-1 и NR1C2 (PPAR- δ). Для M2d-макрофагов характерным маркером является рецептор к фактору роста эндотелия сосудов VEGF-A [9, 12, 24]. Способность M ϕ воспринимать сигналы микроокружения и реагировать на них изменением своего фенотипа обуславливает ключевую роль M ϕ в регуляции множества процессов в организме, включая репарацию и фиброз, и определяет M ϕ как «главные регуляторы воспаления и фиброза» [32].

Непосредственно после повреждения ткани DAMPs (damage-associated molecular patterns), PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) и цитокины нейтрофилов активируют макрофаги (резидентные и рекрутированные моноциты) к продукции хемокинов, матриксных металлопротеиназ (MMPs) и цитокинов (IL-1 β , TNF α и др.), которые координируют развитие воспалительного ответа. Со временем, при нормальном развитии процесса, «воспалительный» фенотип M ϕ меняется на «репаративный», характеризую-

шийся секрецией различных ростовых факторов (VEGF, TGF- β , IGF-1), стимулирующих ангиогенез, а также пролиферацию фибробластов и резидентных прогениторных клеток. Параллельно с изменением фенотипа Мф происходит переключение исходно провоспалительной активности фибробластов на синтез новых компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), необходимых для восстановления нормальной структуры ткани [16]. Активность Мф в каждый конкретный момент тесно координируется с новыми функциями фибробластов и других клеток, участвующих в восстановлении и дифференцировке тканей.

В условиях острого и хронического воспаления нормальная репарация ткани может быть нарушена, что приводит либо к недостаточному восстановлению (длительно незаживающие раны), либо к избыточному накоплению белков внеклеточного матрикса (ВКМ), структурному и функциональному нарушению органа или ткани и развитию фиброза. Известно, что Мф принимают активное участие в регуляции пролиферации и дифференцировки фибробластов, образовании и деградации ВКМ, тем самым способствуя или препятствуя фибротическому процессу [1, 25]. При этом действие Мф может быть прямым или опосредованным растворимыми факторами [6], среди которых наибольший интерес представляют факторы роста и плейотропные цитокины (IL-10, TNF α , IL-4, IL-6, IFN γ и др.), регулирующие активность фибробластов и миофибробластов, а также синтез и продукцию коллагена и других белков ВКМ. Однако данные о способности различных субпопуляций Мф человека, и в особенности субпопуляций M2 Мф, секретировать факторы с про/антифибротической активностью, крайне немногочисленны и зачастую противоречивы. Согласно данным, полученным у экспериментальных животных, M1 Мф могут ингибировать фиброгенез и приводить к развитию вялотекущих раневых процессов [17, 27]. С другой стороны, M2a Мф обладают профибротическими свойствами и способствуют развитию фиброза [5]. Роль M2c Мф в развитии фиброза не выяснена; предполагается, что M2c регулируют реорганизацию ВКМ и ограничение фибротического процесса на завершающих стадиях формирования фиброза. Однако Мф человека в значительной мере отличаются от Мф мыши, в частности по спектру продуцируемых металлопротеиназ [13]. Исходя из вышесказанного, **целью данного исследования** явилась сравнительная характеристика M1-, M2a- и M2c-макрофагов человека по продукции ими про- и антифибротических факторов.

Материалы и методы

Генерация M1, M2a и M2c подтипов макрофагов

В исследование были включены 14 условно здоровых доноров в возрасте 23-49 лет. Монону-

клеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной крови здоровых доноров в градиенте плотности фиколла-верографина (Sigma-Aldrich, США) и далее культивировали в количестве $4-5 \times 10^6$ /мл в 12-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в среде RPMI-1640 («Биолот», Россия), дополненной 0,05 мМ 2-меркаптоэтанолом, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1% незаменимых аминокислот (все реагенты Sigma-Aldrich, США), 10% сыворотки крови плодородной коровы (Biowest, США) и 50 нг/мл рекомбинантного GM-CSF (Sigma-Aldrich, США). Через 1 час неадгезивную фракцию клеток удаляли, а адгезивную фракцию продолжали культивировать в течение 7 дней. Поляризирующие стимулы (10 мкг/мл LPS для M1 (*E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, США) 20 нг/мл IL-4 (Sigma-Aldrich, США) для M2a, 50 нг/мл дексаметазона (Dex) (KRKA, Словения) для M2c) добавляли на 5 день. По окончании срока культивирования макрофаги (Мф) получали при помощи механической диссоциации, подсчитывали количество клеток и определяли их жизнеспособность (по исключению трипанового синего). От каждого донора крови получали как M1, так и M2a и M2c Мф.

Определение цитокинов в культурах Мф

Уровень продукции TNF α , IL-6, IL-2, IL-10 и IL-8 определяли в 7-суточных супернатантах культур GM-CSF-дифференцированных Мф методом проточной флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Rad, Hercules, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США; чувствительность 2 пг/мл), в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Уровень продукция VEGF, MMP-9 и TIMP-1 в супернатантах 7-дневных культур Мф определяли с помощью ELISA kit (все наборы R&D System, США) в соответствии с инструкцией производителя в автоматическом считывателе микропланшетов на длине волны 450 нм. Полученные значения пересчитывали индивидуально с учетом абсолютного количества Мф и выражали в пг/мл/10⁵ клеток-продукцентов.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов производили с помощью программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft. Inc., США). Данные представлены в виде медианных значений с указанием интерквартильных диапазонов (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Достоверность данных оценивалась с помощью критерия Вилкоксона для связанных выборок, критерия Манна-Уитни и критерия знаков; различия считались значимыми при $p < 0,05$. Критерии достоверности * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$.

Результаты

Макрофаги являются основным источником нескольких типов MMPs (MMP-1, MMP-7,

MMP-8, MMP-9 и MMP-12), а также их эндогенных супрессоров, тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMPs). Данные, характеризующие концентрацию MMP-9 и TIMP-1 в 7-дневных супернатантах культур M1 (LPS), M2a (IL-4) и M2c (Dex) представлены на рисунке 1. Видно, что все три исследованные популяции Мф активно продуцировали MMP-9 и TIMP-1. В то же время уровень MMP-9 в культурах M2a (IL-4) и M2c (Dex) макрофагов превышал таковой в культуре M1 (LPS) (4,3 нг/мл, IQR 3,5-6,1). При этом наибольшее содержание MMP-9 выявлялось в культурах M2a (5,5 нг/мл, IQR 3,9-7,4), а наименьшее – в культурах M1 (LPS) Мф (4,3 нг/мл, IQR 3,5-6,1) ($p > 0,05$). Уровень TIMP-1 был максимальным в культурах M2a (0,67 нг/мл, IQR 0,28-0,68) и сопоставимым в культурах M1 Мф (0,62 нг/мл, IQR 0,47-1,05), в то время как M2c Мф демонстрировали наименьший уровень продукции (0,49 нг/мл, IQR 0,09-0,74) ($p > 0,05$).

Так как в регуляции процессов синтеза/деградации соединительной ткани решающее значение играет баланс MMPs и TIMPs, мы проанализировали значения соотношений MMP-9/TIMP-1 для различных типов макрофагов. Оказалось, что наибольшие значения MMP-9/TIMP-1 были характерны для M2c Мф (9,7; IQR 4,7-43,1), в то время как M1 и M2a Мф характеризовались значимо меньшими значениями: 7,42 (IQR 3,6-7,2, $p = 0,045$) и 9,0 (IQR 4,2-16,8, $p = 0,045$) соответственно.

Поскольку синтез MMPs и TIMPs контролируется различными стимулами, в том числе растворимыми медиаторами, на следующем этапе мы исследовали концентрацию некоторых цитокинов и ростовых факторов в 7-дневных супернатантах культур M1 (LPS), M2a (IL-4) и M2c

(Dex), стандартизованных по количеству (рис. 2). Видно, что M1 (LPS) Мф отличались высоким уровнем продукции провоспалительных цитокинов – TNF α (Me 48470 пг/мл), IL-6 (588 пг/мл) и IL-2 (358 пг/мл). Кроме того, M1 (LPS) макрофаги активно продуцировали противовоспалительный цитокин IL-10 (103 пг/мл), а также VEGF (325 пг/мл) и хемокин IL-8 (7904 пг/мл).

По сравнению с M1 (LPS), M2 Мф характеризовались выраженным снижением продукции провоспалительных цитокинов. Наиболее ярко это проявлялось в отношении TNF α , содержание которого в супернатантах M2a (IL-4) и M2c (Dex) было снижено практически в 70 раз и составляло, соответственно, 733 пг/мл (*vs* 48470; $p = 0,08$) и 701 пг/мл (*vs* 48470; $p = 0,049$). Уровень продукции IL-6 был снижен более чем в 2 раза как в культурах M2a (IL-4) (249 *vs* 588 пг/мл; $p = 0,03$), так и в супернатантах M2c (Dex) макрофагов (253 *vs* 588 пг/мл; $p = 0,025$). В культурах M2a (IL-4) и M2c (Dex) Мф регистрировалось также практически 5-кратное снижение продукции IL-2. Так, M2a (IL-4) Мф продуцировали IL-2 на уровне 75 пг/мл (*vs* 358; $p = 0,03$), а M2c (Dex) – 81 пг/мл (*vs* 358; $p = 0,049$). Наряду со сниженным уровнем TNF α , IL-6 и IL-2, M2 макрофаги демонстрировали низкий уровень продукции IL-10. Действительно, по сравнению с M1 (LPS), содержание IL-10 в культурах M2a (IL-4) и M2c (Dex) макрофагов составляло 6,1 и 4,8 пг/мл соответственно ($p < 0,05$ в обоих случаях).

В противоположность снижению продукции про- и противовоспалительных цитокинов, M2a (IL-4) и M2c (Dex) макрофаги активно продуцировали VEGF и IL-8. Из рисунка 2 видно, что уровень VEGF в культурах M2a (IL-4) макрофагов более чем в 6 раз превышал таковой в супернатан-

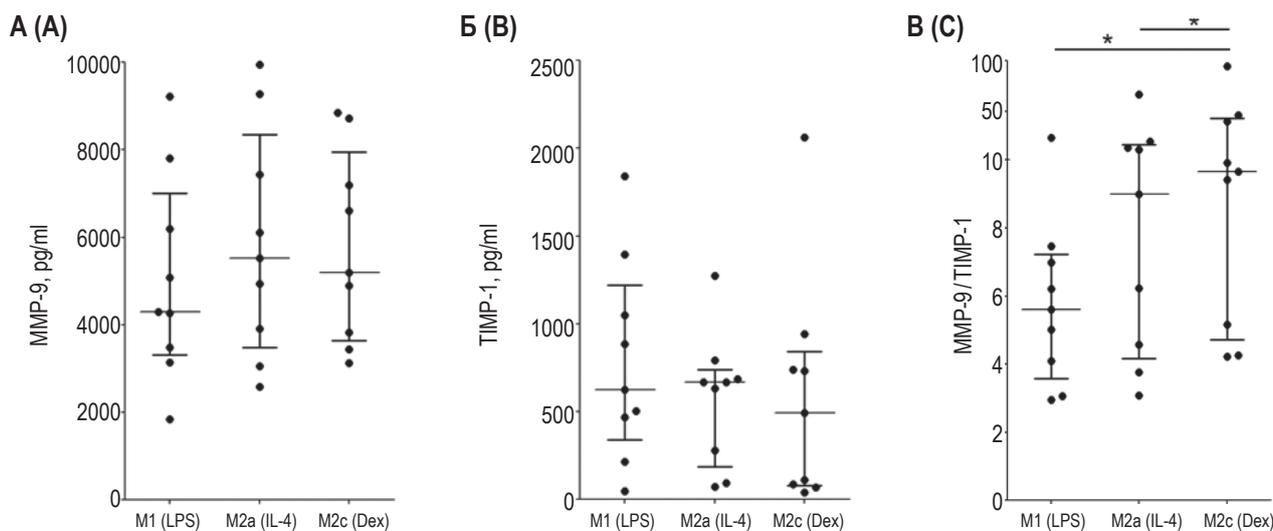


Рисунок 1. Продукция MMP-9 и TIMP-1 различными субпопуляциями макрофагов

Примечание. Данные представлены в виде индивидуальных значений, медианы и интерквартильного диапазона, * – $p < 0,05$.

Figure 1. MMP-9 and TIMP-1 production by various macrophage subpopulations

Note. Data are presented as individual values, median and interquartile range, * – $p < 0.05$.

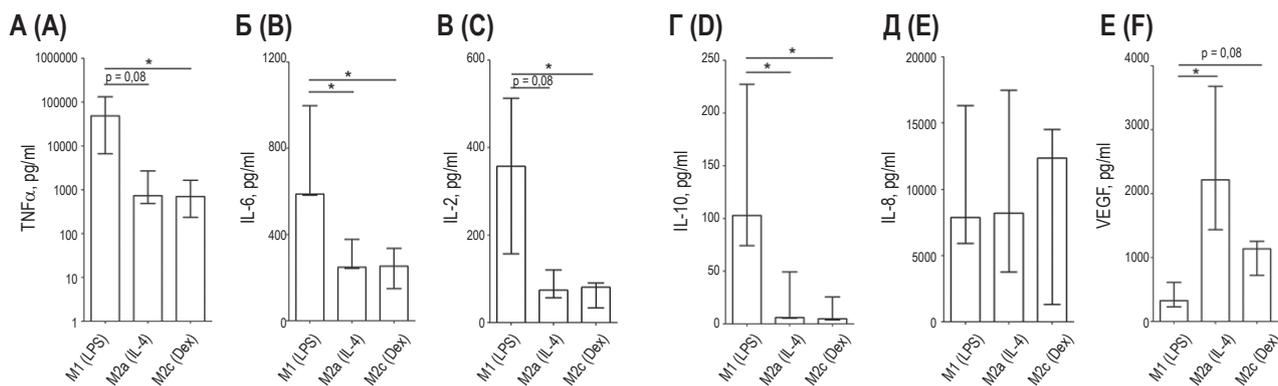


Рисунок 2. Содержание цитокинов в супернатантах 7-дневных культур M1 и M2 макрофагов

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона, * – $p < 0,05$.

Figure 2. The content of cytokines in the supernatants of 7-day-old cultures of M1 and M2 macrophages

Note. Data are presented as the median and interquartile range, * – $p < 0.05$.

тах M1 (LPS) Мф (2215 vs 325 пг/мл; $p = 0,009$) и практически в 2 раза – в супернатантах M2c (Dex) (2215 vs 1137; $p = 0,07$). Уровень продукции IL-8 был наиболее высоким в культурах M2c (Dex) Мф (12330 пг/мл), что более чем в 1,5 раза превышало содержание IL-8 в культурах M1 (LPS) Мф, однако эти различия были недостоверны ($p > 0,05$).

Сравнительный анализ секреторной активности двух субпопуляций M2-макрофагов, M2a (IL-4) и M2c (Dex), показал, что спектр и уровень продукции большинства исследуемых цитокинов в супернатантах указанных Мф был схожим. Действительно, M2a (IL-4) и M2c (Dex) Мф характеризовались низкой продукцией про- и противовоспалительных цитокинов и высоким уровнем продукции ростовых факторов и хемокинов. Примечательно при этом, что M2a (IL-4) клетки демонстрировали максимальный уровень VEGF, в то время как в культурах M2c (Dex) содержание VEGF было также повышенным по сравнению с M1 (LPS) Мф, однако не достигало уровня M2a (IL-4) ($p < 0,05$).

Обсуждение

Благодаря пластичности и широкому спектру продуцируемых растворимых факторов, макрофаги регулируют течение фибротического процесса, последовательно изменяя свой функциональный фенотип в зависимости от стадии. Так, предполагают, что M1 Мф принимают участие в запуске фибротического процесса, хотя на более поздних стадиях могут препятствовать нормальному ранозаживлению. Так, например, было показано, что в краях хронически незаживающих ран преобладают M1-макрофаги, играющие основную роль в патогенезе хронизации раны [12]. Переключение M1-фенотипа на M2a ассоциируется со снижением воспалительной активности и переходом в стадию пролиферации, характеризующуюся активацией миофибробластов и активным отложением внеклеточного матрикса

(ВКМ). На стадии разрешения фиброза ключевая роль отводится M2c Мф – считается, что они обеспечивают реорганизацию соединительной ткани и ограничение фибротического процесса [9].

Макрофаги продуцируют несколько типов матричных металлопротеиназ (MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12) и их тканевых ингибиторов (TIMP). MMPs отвечают за разрезание компонентов внеклеточного матрикса (преимущественно коллагена), а TIMPs, связываясь с их активными сайтами, ингибируют действие MMPs. Уровень синтеза MMPs и TIMPs может регулироваться различными стимулами, среди которых ключевую роль играют ростовые факторы и цитокины. Баланс MMPs и TIMPs в организме имеет решающее значение для нормального течения процессов синтеза и деградации соединительной ткани, а нарушение этого баланса может приводить к развитию фиброза – избыточной продукции и отложению ВКМ.

Среди различных металлопротеиназ макрофагальной природы MMP-9 является наиболее важной профиброгенной металлопротеиназой, ингибирование или делеция которой снижает фиброз в моделях дилатационной кардиомиопатии и инфаркта миокарда [18, 22]. В настоящем исследовании показано, что наибольший уровень продукции MMP-9 и TIMP-1 выявляется в культурах GM-CSF-дифференцированных M2a (IL-4) Мф. При этом активность TIMP-1 представляет интерес не только с точки зрения MMP-ассоциированных эффектов на функционирование ВКМ. Известно, что семейство TIMP, включая TIMP-1, участвует в регуляции роста различных типов клеток, в частности стимулируя пролиферацию фибробластов [21]. Исходя из этого, высокий уровень продукции TIMP-1, с одной стороны, способствует снижению активности MMPs, а с другой – усиливает рост фибробластов, что является основным фактором развития фиброза. В совокупности эти данные

свидетельствуют о профиброгенном потенциале M2a (IL-4) Мф. В отличие от M2a, M2c (Dex) Мф характеризуются наименьшим уровнем продукции TIMP-1 и высоким соотношением MMP-9/TIMP-1. Считается, что роль M2c Мф значительно возрастает в фазе ремоделирования [9], поэтому преобладание MMP-9 над TIMP-1 в культурах M2c (Dex) Мф может указывать на способность этого типа Мф ограничивать синтез соединительной ткани. Кроме того, низкий уровень TIMP-1 прямо коррелирует со сниженной пролиферацией фибробластов, что также способствует ограничению фиброза [20].

Говоря о роли MMPs в фиброгенезе, важно понимать, что разные типы клеток-продуцентов MMPs (эпителиальные клетки, фибробласты, макрофаги, фиброциты или лейкоциты периферической крови) оказывают различное влияние на фибротический процесс, так что повышенная экспрессия MMP в одном типе клеток может быть «профиброгенной», тогда как в другом — отражать «антифиброгенную» активность. Подобно этому, MMPs могут иметь одну функцию на ранних стадиях процессов заживления ран и совершенно противоположную — в поддержании или распространении фиброза. Следовательно, практически невозможно охарактеризовать конкретную MMP исключительно как «про-» или «анти-» профиброгенную [3].

Синтез MMPs и TIMPs контролируется различными сигналами микроокружения, в том числе ростовыми факторами и цитокинами. Известно, что в регуляции синтеза ВКМ ключевую роль играет TGF- β 1 [23]. В то же время различные факторы воспалительного микроокружения, включая цитокины, также оказывают влияние на фиброгенез, действуя либо непосредственно на продукцию белков ВКМ, либо через TGF- β 1-индуцированные эффекты. При этом эффекты цитокинов могут значительно варьировать в зависимости от стадии фибротического процесса. В исследованиях, выполненных преимущественно на экспериментальных животных, показано, что TNF α и IL-6 имеют ключевое значение на начальных этапах. Так, было продемонстрировано, что TNF α запускает формирование фиброза печени и способствует его прогрессии [34], а использование анти-TNF α моноклональных антител предотвращает развитие фиброза [31]. Аналогичной способностью запускать фибротический процесс обладает и IL-6 [7]. Помимо этого, в исследовании Liu X. было показано, что провоспалительные цитокины — IL-1 β , TNF α и IFN γ — усиливают TGF- β 1-индуцированную продукцию ВКМ через активацию рецептора TGF- β типа I [19]. Полученные нами результаты о выраженной продукции TNF α и IL-6 M1 (LPS) макрофагами согласуются с вышеупомянутыми работами и свидетельствуют о способности M1 (LPS) Мф с провоспалительным фенотипом иници-

ровать фиброз. Не противоречит такому взгляду на M1 (LPS) Мф и высокий уровень продукции IL-2 в культурах этих клеток. Считается, что IL-2 может вносить непосредственный вклад в активность фибробластов, поскольку фибробласты экспрессируют функционально активные IL-2R, в частности субъединицы β и γ [4]. В качестве одного из механизмов IL-2-индуцированного роста фибробластов рассматривается аутофагия [15].

На более поздних стадиях фиброза (пролиферативной стадии и стадии разрешения) TNF α и IL-6 могут оказывать ингибирующее влияние на развитие фиброза. Так, например, показано, что TNF α подавляет экспрессию гена α 1-цепи коллагена I [11]. Согласно данным Redente E.F. и соавт., введение TNF α мышам с развившимся легочным фиброзом уменьшает фиброзную нагрузку, улучшает функцию и архитектуру легких [26]. С учетом определяющей роли стадии фиброза как для реализации эффектов цитокинов, так и в плане доминирующего фенотипа Мф, относительно невысокое содержание TNF α и IL-6 в культурах M2a (IL-4) может указывать на профибротические свойства M2a, а в культурах M2c (Dex) Мф — отражать антифибротические свойства M2c макрофагов. Следует подчеркнуть, что двойственный характер эффектов описан и для других цитокинов — IFN γ , IL-4 и др. [14, 30].

Наряду с ожидаемо высокой секрецией провоспалительных цитокинов, M1 (LPS) макрофаги в нашем исследовании продуцировали также значимо более высокие количества (по сравнению с M2 Мф) IL-10, который, как полагают, обладает антифиброгенным эффектом [28]. Данная особенность M1-макрофагов может быть связана с природой используемого поляризующего стимула, так как известно, что LPS индуцирует продукцию IL-10 в Мф [2, 29].

Ростовые факторы также принимают активное участие в процессе фиброгенеза, в основном оказывая профиброгенное (TGF- β , PDGF, FGF, VEGF, IGF) и в некоторых случаях — антифиброгенное действие (HGF) [28]. При этом если TGF- β является ключевым профиброгенным фактором, то роль некоторых других ростовых факторов, в частности VEGF, в развитии фибротического процесса не так однозначна. Показано, что VEGF, с одной стороны, может оказывать стимулирующий эффект на пролиферацию и активацию фибробластов, а с другой — играет важную роль в разрешении фиброза [33]. В модели блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей VEGF описывается как профиброгенный медиатор [10]. Выявленный нами высокий уровень продукции VEGF в культурах M2a Мф может указывать на способность данного типа Мф оказывать профиброгенный эффект на пролиферативной стадии развития фиброза. С другой стороны, VEGF, продуцируемый M2c Мф, роль

которых возрастает на стадии ремоделирования, по-видимому, необходим для нормального разрешения фибротического процесса.

В целом исследование секреторной активности макрофагов показало, что M1 (LPS) Мф могут принимать участие на ранних этапах формирования фиброза (этапах инициации), продуцируя такие провоспалительные цитокины, как TNF α и IL-6. В свою очередь, M2a (IL-4) Мф продуцируют факторы, которые на пролиферативной стадии фиброза обеспечивают активацию фибробластов, их пролиферацию и синтез коллагена, что говорит об их важной роли в разгара фибротического процесса. И наконец, M2c Мф харак-

теризуются высоким уровнем продукции VEGF, а также индексом соотношения MMP-9/TIMP-1, которые играют важную роль на стадии разрешения. Полученные нами данные могут свидетельствовать о том, что секреторная активность различных подтипов макрофагов является отражением их роли в регуляции фиброза. В то же время, поскольку в основе развития фиброза лежит пролиферация фибробластов, целью наших дальнейших исследований является изучение влияния различных типов макрофагов на рост и функциональную активность фибробластов, что позволит наиболее полно охарактеризовать участие макрофагов в развитии фиброза.

Список литературы / References

1. Adhyatmika A., Putri K.S.S., Beljaars L., Melgert B.N. The elusive antifibrotic macrophage. *Front. Med.*, 2015, Vol. 2, pp. 1-11.
2. Chanteux H., Guisset A.C., Pilette C., Sibille Y. LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKinasases- and Sp1-dependent mechanisms. *Respir. Res.*, 2007, Vol. 8, pp. 1-10.
3. Craig V.J., Zhang L., Hagoood J.S., Owen C.A. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2015, Vol. 53, no. 5, pp. 585-600.
4. Doersch K.M., DelloStritto D.J., Newell-Rogers M.K. The contribution of interleukin-2 to effective wound healing. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2017, Vol. 242, no. 4, pp. 384-396.
5. Duan J., Liu X., Wang H., Guo S.W. The M2a macrophage subset may be critically involved in the fibrogenesis of endometriosis in mice. *Reprod. Biomed. Online*, 2018, Vol. 37, no. 3, pp. 254-268.
6. Feng Y., Sun Z.L., Liu S.Y., Wu J.J., Zhao B.H., Lv G.Z., Du Y., Yu S., Yang M.L., Yuan F.L., Zhou X.J. Direct and indirect roles of macrophages in hypertrophic scar formation. *Front. Physiol.*, 2019, no. 10, 1101. doi: 10.3389/fphys.2019.01101.
7. Fielding C.A., Jones G.W., McLoughlin R.M., McLeod L., Hammond V.J., Uceda J., Williams A.S., Lambie M., Foster T.L., Liao C., Rice C.M., Greenhill C.J., Colmont C.S., Hams E., Coles B., Kift-Morgan A., Newton Z., Craig K.J., Williams J.D., Williams G.T., Davies S.J., Humphreys I.R., O'Donnell V.B., Taylor P.R., Jenkins B.J., Topley N., Jones S.A. Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. *Immunity*, 2014, Vol. 40, no. 1, pp. 40-50.
8. Fraternali A., Brundu S., Magnani M. Polarization and repolarization of macrophages. *J. Clin. Cell. Immunol.*, 2015, Vol. 6, no. 2, pp. 1-10.
9. Gensel J.C., Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.*, 2015, Vol. 1619, pp. 1-11.
10. Hamada N., Kuwano K., Yamada M., Hagimoto N., Hiasa K., Egashira K., Nakashima N., Maeyama T., Yoshimi M., Nakanishi Y. Anti-vascular endothelial growth factor gene therapy attenuates lung injury and fibrosis in mice. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 2, pp. 1224-1231.
11. Hernandez-Munoz I., de la Torre P., Sanchez-Alcazar J.A., Garcia I., Santiago E., Munoz-Yague M.T., Solis-Herruzo, J.A. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen alpha 1 (I) gene expression in rat hepatic stellate cells through a G protein. *Gastroenterology*, 1997, Vol. 113, no. 2, pp. 625-640.
12. Hesketh M., Sahin K.B., West Z.E., Murray R.Z. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 7, 1545. doi: 10.3390/ijms18071545.
13. Huang W.C., Sala-Newby G.B., Susana A., Johnson J.L., Newby A.C. Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor- κ B. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 8, e42507. doi: 10.1371/journal.pone.0042507.
14. Huaux F., Liu T., McGarry B., Ullenbruch M., Phan S.H. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 4, pp. 2083-2092.
15. Kang R., Tang D., Lotze M.T., Zeh Iii H.J. Autophagy is required for IL-2-mediated fibroblast growth. *Exp. Cell Res.*, 2013, Vol. 319, no. 4, pp. 556-565.
16. Karin M., Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature*, 2016, Vol. 529, no. 7586, pp. 307-315.
17. Li B., Liu Y.M., Yan Y., Yang N., Gao J., Jiang T., Shang X.Q., Tian F.M., Ding J.B., Ma X.M. Effect of different types of macrophages on hepatic fibrosis in *Echinococcus Granulosus* mice. *Biomed. Pharmacother.*, 2019, Vol. 117, 109178. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109178.
18. Lim D.H., Cho J.Y., Miller M., McElwain K., McElwain S., Broide D.H. Reduced peribronchial fibrosis in allergen-challenged MMP-9-deficient mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2006, Vol. 291, no. 2, pp. L265-L271.
19. Liu X. Inflammatory cytokines augments TGF- β 1 - induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating T β R-I. *Cell Motil. Cytoskeleton.*, 2008, no. 65, pp. 935-944.
20. Lovelock J.D., Baker A.H., Gao F., Dong J.F., Bergeron A.L., McPheat W., Sivasubramanian N., Mann D.L. Heterogeneous effects of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases on cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2005, Vol. 288, no. 2, pp. H461-H468.

21. Lu Y., Liu S., Zhang S., Cai G., Jiang H., Su H., Li X., Hong Q., Zhang X., Chen X. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes NIH3T3 fibroblast proliferation by activating p-Akt and cell cycle progression. *Mol. Cells*, 2011, Vol. 31, no. 3, pp. 225-230.
22. Matsumoto Y., Park I.K., Kohyama K. Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of c protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 7, pp. 4773-4781.
23. Meng X.M., Nikolic-Paterson D.J., Lan H.Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2016, Vol. 12, no. 6, pp. 325-338.
24. Nikonova A.A., Khaitov M.R., Khaitov R.M. Characteristics and role of macrophages in pathogenesis of acute and chronic lung diseases. *Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 657-672. doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-657-672
25. Pakshir P., Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol.*, 2018, Vol. 68-69, pp. 81-93.
26. Redente E.F., Keith R.C., Janssen W., Henson P.M., Ortiz L.A., Downey G.P., Bratton D.L., Riches D.W. Tumor necrosis factor- α accelerates the resolution of established pulmonary fibrosis in mice by targeting profibrotic lung macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2014, Vol. 50, no. 4, pp. 825-837.
27. Sindrilaru A., Peters T., Wieschalka S., Baican C., Baican A., Peter H., Hainzl A., Schatz S., Qi Y., Schlecht A., Weiss J.M., Wlaschek M., Sunderkötter C., Scharfetter-Kochanek K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J. Clin. Invest.*, 2011, Vol. 121, no. 3, pp. 985-997.
28. Sziksz E., Pap D., Lippai R., Béres N.J., Fekete A., Szabó A.J., Vannay Á. Fibrosis related inflammatory mediators: role of the IL-10 cytokine family. *Mediators Inflamm.*, 2015, 764641. doi: 10.1155/2015/764641.
29. van der Plas M.J.A., van Dissel J.T., Nibbering P.H. Maggot secretions skew monocyte-macrophage differentiation away from a pro-inflammatory to a pro-angiogenic type. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, no. 11, e8071. doi: 10.1371/journal.pone.0008071.
30. Weng H.-L., Wang B.-E., Jia J.-D., Wu W.-F., Xian J.-Z., Mertens P.R., Cai W.-M., Dooley S. Effect of interferon-gamma on hepatic fibrosis in chronic hepatitis B virus infection: a randomized controlled study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2005, Vol. 3, no. 8, pp. 819-828.
31. Westermann D., Linthout S., Dhayat S., Dhayat N., Schmidt A., Noutsias M., Song X.-Y., Spillmann F., Riad A., Schultheiss H.-P., Tschöpe C. Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res. Cardiol.*, 2007, Vol. 102, no. 6, pp. 500-507.
32. Wynn T., Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver Dis.*, 2010, Vol. 30, no. 3, pp. 245-257.
33. Yang L., Kwon J., Popov Y., Gajdos G.B., Ordog T., Brekken R.A., Mukhopadhyay D., Schuppan D., Bi Y., Simonetto D., Shah V.H. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology*, 2014, Vol. 146, no. 5, pp. 1339-1350.e1.
34. Yang Y.M., Seki E. TNF α in liver fibrosis. *Curr. Pathobiol. Rep.*, 2015, Vol. 3, no. 4, pp. 253-261.

Авторы:

Максимова А.А. — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

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

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

Authors:

Maksimova A.A., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shevela E. Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sakhno L.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Поступила 18.02.2020

Отправлена на доработку 18.03.2020

Принята к печати 17.04.2020

Received 18.02.2020

Revision received 18.03.2020

Accepted 17.04.2020

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ КЛЕТОК ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ ЛИНИИ NK-92 С ПОМОЩЬЮ MALDI-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

**Корневский А.В.¹, Щербицкая А.Д.², Березкина М.Э.¹,
Маркова К.Л.¹, Александрова Е.П.¹, Балабас О.А.³, Сельков С.А.^{1,4},
Соколов Д.И.^{1,4}**

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

² ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия

³ Ресурсный центр «Методы анализа состава вещества» ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Отделяющиеся от плазматической мембраны клетки экстраклеточные везикулы служат транспортерами широкого спектра молекул, среди которых важное функциональное значение придается белкам, липидам, нуклеиновым кислотам и сахарам. Цитотоксические белки естественных киллеров играют ключевую роль в осуществлении их цитолитических функций. Одним из важных этапов в понимании дистантной коммуникации клеток и механизмов ее регуляции является определение протеомного состава микровезикул. Целью данного исследования явилось изучение протеомного состава микровезикул, образуемых клетками естественных киллеров линии NK-92. В результате MALDI-TOF-масс-спектрометрического анализа белковых фракций лизата микровезикул было идентифицировано 986 белков, выполняющих различные функции. С помощью автоматизированных методов функционального анализа показано, что наибольшие по численности группы белков представляют гипотетические белки, белки с неизвестными функциями, домены. Наиболее представительные группы также образуют регуляторы транскрипции, белки внутриклеточной сигнализации, регуляторы трансляции, транскрипции, процессинга и утилизации РНК, рецепторы, регуляторы процессинга и протеолиза белков, ферменты обмена аминокислот, а также транспортные белки и регуляторы транспорта. Минорные функциональные группы представлены ферментами обмена витаминов и минерального обмена, мембранными и микродоменобразующими белками, гормонами, регуляторами гемостаза, сенсорных систем, специфическими митохондриальными белками и белками аппарата Гольджи, белками межклеточной сигнализации. Промежуточное положение занимают

Адрес для переписки:

Корневский Андрей Валентинович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии и репродуктологии имени
Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 328-98-91, 323-75-45.
Факс: 8 (812) 323-75-45.
E-mail: a.korenevsky@yandex.ru

Address for correspondence:

Korenevsky Andrey V.
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology,
and Reproductology
199034, Russian Federation, St. Petersburg,
Mendeleyevskaya line, 3.
Phone: 7 (812) 328-98-91, 323-75-45.
Fax: 7 (812) 323-75-45.
E-mail: a.korenevsky@yandex.ru

Образец цитирования:

А.В. Корневский, А.Д. Щербицкая, М.Э. Березкина,
К.Л. Маркова, Е.П. Александрова, О.А. Балабас,
С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Протеомное
профилирование микровезикул клеток естественных
киллеров линии NK-92 с помощью MALDI-масс-
спектрометрии» // Медицинская иммунология, 2020.
Т. 22, № 4. С. 633-646.
doi: 10.15789/1563-0625-MMS-1976
© Корневский А.В. и соавт., 2020

For citation:

A.V. Korenevsky, A.D. Shcherbitskaya, M.E. Berezkina,
K.L. Markova, E.P. Alexandrova, O.A. Balabas, S.A. Selkov,
D.I. Sokolov "MALDI-TOF mass spectrometric protein
profiling of microvesicles produced by the NK-92 natural killer
cell line", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 4,
pp. 633-646.
doi: 10.15789/1563-0625-MMS-1976
DOI: 10.15789/1563-0625-MMS-1976

различные функциональные группы, в том числе белки цитоскелета, структурные и моторные белки, белки центриолей, ионные каналы и их регуляторы, белки убиквитин-протеасомной системы деградации белков, ферменты обмена липидов, стероидов и жирных кислот, нуклеиновых (азотистых) оснований, углеводов, а также ферменты энергетического обмена и другие белки-участники промежуточного метаболизма, белки иммунного ответа и воспаления, антигены и белки гистосовместимости, цитокины и факторы роста, регуляторы апоптоза, аутофагоцитоза, эндоцитоза и экзоцитоза, регуляторы клеточного цикла и деления, регуляторы пролиферации, клеточной дифференцировки и морфогенеза, регуляторы клеточной адгезии, метаболизма матрикса и адгезии к нему, ядерные транспортные белки, белки транспозиции, белки систем репликации и репарации ДНК, а также неактивные белки. Полученные данные расширяют имеющиеся представления о дистантной коммуникации клеток и указывают на новые механизмы взаимодействия естественных киллеров и клеток-мишеней.

Ключевые слова: естественные киллеры, микровезикулы, иммунный ответ, воспаление, протеом, MALDI-TOF-масс-спектрометрия

MALDI-TOF MASS SPECTROMETRIC PROTEIN PROFILING OF MICROVESICLES PRODUCED BY THE NK-92 NATURAL KILLER CELL LINE

Korenevsky A.V.^a, Shcherbitskaya A.D.^b, Berezkina M.E.^a,
Markova K.L.^a, Alexandrova E.P.^a, Balabas O.A.^c, Selkov S.A.^{a,d},
Sokolov D.I.^{a,d}

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

^b I. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

^c Chemical Analysis and Materials Research Centre, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Extracellular vesicles that are shed from the plasma membrane contain a wide range of molecules, among which are proteins, lipids, nucleic acids, and sugars. The cytotoxic proteins of natural killer cells play a key role in the implementation of their cytolytic functions. One of the important steps in understanding the distant communication of cells is the determination of the proteome of microvesicles. This study was aimed at the protein profiling of the microvesicles produced by the NK-92 natural killer cell line. 986 proteins with a variety of functions were identified in the lysate of microvesicles using the MALDI-TOF mass spectrometric analysis. With automated methods of functional analysis applied, it has been shown that the largest protein groups are hypothetical proteins, proteins with unknown functions, and domains. The most representative groups are also comprised by transcription regulators; intracellular signaling proteins; RNA translation, transcription, processing, and utilization regulators; receptors; protein processing and proteolysis regulators; amino acid metabolism enzymes, as well as transport proteins and transport regulators. Minor functional groups are represented by vitamins and mineral metabolism enzymes, membrane and microdomain-forming proteins, hormones, hemostatic regulators, regulators of sensory systems, specific mitochondrial and Golgi apparatus proteins, and extracellular signaling proteins. An intermediate position is occupied by various functional groups, including cytoskeleton and motor proteins; proteins of centrioles; ion channels and their regulators; proteins of the ubiquitin-proteasome pathway of protein degradation; lipid, steroid, and fatty acid metabolism enzymes; nucleic acid base and carbohydrate metabolism enzymes, as well as energy metabolism enzymes and other proteins involved in intermediate metabolism; proteins of the immune response and inflammation; antigens and histocompatibility proteins; cytokines and growth factors; regulators of apoptosis, autophagy, endocytosis, and exocytosis; regulators of the cell cycle and division; regulators of proliferation, cell differentiation, and morphogenesis; regulators of cell adhesion and matrix metabolism; nuclear transport proteins; transposition proteins; DNA replication and repair proteins, as well as inactive proteins. The data obtained expand the existing knowledge of the distant communication of cells and indicate new mechanisms of interaction between natural killer and target cells.

Keywords: natural killer cells, microvesicles, immune response, inflammation, proteome, MALDI-TOF mass spectrometry

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project Registration No. 19-015-00218) and was performed in the Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology (St. Petersburg, Russia), partially within the institutional state assignment framework (R&D State Registration No. AAAA-A19-119021290116-1), using the equipment of Chemical Analysis and Materials Research Centre, St. Petersburg State University (St. Petersburg, Russia).

Introduction

Microvesicles (MVs) are subcellular structures that are shed from the plasma membrane and may participate in intercellular communication. MVs transfer various proteins, nucleic acids, lipids, and sugars from cell to cell and are involved in the regulation of various biological processes, including angiogenesis, placentation, regeneration, and malignancy [18].

Of particular interest among various MV sources are natural killer (NK) cells, which are a lymphocyte subpopulation that carries out contact cytotoxicity of virus-infected and tumor cells, and exerts a regulatory function. There is indirect evidence that NK cells are able to produce MVs, since the cells with the CD56 phenotype, as well as those of leukocyte origin with different phenotypes, were found in peripheral blood plasma [29].

The cytotoxic activity of exosomes derived from activated peripheral blood NK cells against various tumor cell lines has been shown in a number of studies devoted to the isolation and description of various extracellular MVs released from NK cells. According to the authors, this cytotoxicity is exerted due to Fas ligand molecules being expressed on their surface [16], as well as effector molecules, namely perforin [8, 16], granzymes, and granulysin, being transferred [8]. The authors of these studies consider promising the use of extracellular MV preparations obtained from NK cells in the treatment of various tumors.

In the above studies, activated peripheral blood NK cells were mainly used, however, the use of their MVs for immunotherapy is fraught with considerable difficulties, among which are the search for suitable donors and the isolation of a sufficient amount of biomaterial [16]. The use of MVs obtained from the NK-92 cell line (NK-92 cells) for this purpose seems more promising due to the ease of their preparation in large quantities and the severity of their cytotoxic effect [16].

Facing the potential prospect of using NK-92 cell-derived MVs for delivery of antitumor drugs and regulatory molecules to target cells [36], the study of functional properties, phenotype, and biochemical cargo of these MVs seems to be an important area of

research, which will possibly allow evaluating both positive and negative effects of such therapy.

Cytotoxic proteins of NK cells (Fas ligand, perforin, granzymes, granulysin, and LL-37 polypeptide) play a key role in the implementation of their cytolytic functions [7, 8, 11, 15, 16, 17, 26]. The protein profiling of MVs capable of contributing to the cytotoxic effect of NK cells against target cells is one of the important steps in understanding the distant communication of cells and the mechanisms of its regulation. Data to be obtained on the proteomic composition of the NK cell-derived MVs would allow assessing previously unknown mechanisms of interaction between NK and target cells under physiological and pathophysiological conditions.

Earlier, using two-dimensional gel electrophoresis coupled with Q-TOF mass spectrometry, we identified a number of proteins in MVs released from NK-92 cells, among which were found granzyme A, heat shock proteins, components of the ubiquitin-proteasome system, protein biosynthesis and energy metabolism enzymes, nuclear and serum proteins, and cytoskeleton proteins [12]. Given the limitations of our own data obtained, as well as the incompleteness of information on the proteome of the source cells [15, 17, 26], **this study was aimed** at expanding the existing knowledge of the proteomic profile of the MVs. To undertake this, MALDI-TOF mass spectrometry was used to identify tryptic peptides in protein fractions obtained from NK-92 cell-derived MV lysates by isoelectric focusing in the liquid phase.

Materials and methods

Cells and cell culture

The cells of the NK-92 cell line (American Tissue Culture Collection, USA), obtained from large granular peripheral blood lymphocytes of a 50-year-old man with rapidly progressive non-Hodgkin's lymphoma, reproduce the main phenotypic and functional characteristics of activated NK cells. The NK-92 cell line is a suspension culture, requiring subculturing every 48 hr. The cells were cultured spontaneously using the complete cell culture medium based on the α -modification of the Minimum Eagle medium (α -MEME; BioloT Ltd., Russia) supplemented with 12.5% inactivated fetal calf serum, 12.5% inactivated donor horse serum (both depleted of their own MVs using membrane filters with a pore diameter of 0.1 μ m), 0.2 mM myoinositol, 0.02 mM folic acid, 2 mM L-glutamine, 100 μ g/mL streptomycin, 100 IU/ml penicillin, 10 mM HEPES buffer solution, 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA), and 500 IU/ml recombinant IL-2 (Roncoleukinum; Biotech Ltd., Russia). The cells were cultured using standard cell culture procedures under the damp atmosphere at 37 °C and 5% CO₂. Using the trypan blue solution,

the cell vitality was evaluated, which was not less than 96%.

Isolation of biomaterial

Due to no single standard protocol available for the isolation and characterization of MVs, various methodological approaches are currently used to obtain MV fractions with a proper degree of purity and enrichment. The MVs separated from NK-92 cells were isolated by the modified step-wise centrifugation method [29] in Hanks's solution without Ca^{2+} and Mg^{2+} (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA), for which the supernatants were sequentially centrifuged at 200 g (room temperature, 10 min) and 9 900 g (4 °C, 10 min). The pellet after the second centrifugation was washed twice with cold phosphate buffer solution (PBS; Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) and recentrifuged at 19 800 g (4 °C, 20 min). The supernatant was discarded, the pellet being washed several times with cold PBS, each time precipitating the MVs by centrifugation at 19 800 g (4 °C, 20 min). The purified pellet was resuspended in MilliQ deionized water, with the protease inhibitor mixture (cOmplete, EDTA-free; Roche Diagnostics GmbH, Germany) added at the concentration specified by the manufacturer, and was then stored at -80 °C until being analyzed. This protocol allows isolating MVs with a diameter of 100-200 nm with sufficient purity and minimal losses of the biomaterial, while the MVs are sequentially separated from coarse particles of cellular debris and large apoptotic bodies, as well as from exosomes.

Laser correlation analysis

The granulometric analysis of the MVs released from NK-92 cells was performed by the dynamic light scattering method described elsewhere [12]. The MV diameter was calculated using Zetasizer Software 7.11 (Malvern Instruments, UK). The dimensions of the MVs were shown to lie in the 190-460 nm range corresponding to the diameter of ectosomes (100-1000 nm), the peak size being equal to 295 nm (40.8%, $n = 3$). The data obtained by us are consistent with the results of other researchers who evaluated the size of MVs produced by different cells [32]. Besides, the analysis of the supernatant obtained after the MV isolation showed that sizes of remnant particles lay in the range of 15-190 nm, the peak size being equal to 28 nm (less than 30%, $n = 3$).

Biomaterial preparation

The frozen MVs were thawed and subjected to repeated "freeze-thaw" cycles five times, and were then intensively homogenized in a glass homogenizer for 5 min. The debris was removed by centrifugation at 16 000 g (4 °C, 10 min), and the supernatant collected for further investigation.

Spectrophotometric analysis

The analysis of the MV protein content was performed through the Bradford protein assay

using the NanoDrop One spectrophotometer and NanoDrop One Viewer software (Thermo Scientific, USA).

Isoelectric focusing

To separate the MV proteins, the isoelectric focusing method in the liquid phase was used. This method was performed on an OFFGEL High Resolution IPG strip (24 cm) with the immobilized pH 3-10 gradient in the 3100 OFFGEL Fractionator chamber (Agilent Technologies, USA) under active rehydration and subsequent separation at 200-3 400 V (20 °C, 24 hr). The strip was loaded with the MV lysate so that the protein content (150 µg) in the strip was sufficient to obtain valid data. The analysis was performed under denaturing conditions in accordance with the manufacturer's protocol (Agilent Technologies, USA). For isolation from the environment, the strip in the chamber was covered with mineral oil.

MALDI-TOF mass spectrometric analysis

After isoelectric focusing, the protein fractions were mixed with ice-cold acetone ("extra pure grade", Khimmed Ltd., Russia) (3:1, v/v) and were incubated at -20 °C for 30 min. The precipitated proteins were then centrifuged at 15 000 g (4 °C, 10 min), with the obtained supernatant discarded and the precipitates washed with a cooled acetone-water mixture (4:1, v/v), followed by being recentrifuged and dried up in the air at room temperature until the smell of acetone was gone. Thereafter, 10 µl of modified bovine trypsin solution (Promega, USA) were added to the dried samples at a concentration of 20 ng/ml and incubated first for 1 hr on ice and then for 16-18 hr at 37 °C. Mixtures of tryptic peptides in the solutions were dried up in the air at 4 °C and were then dissolved in 50 µl of 50% acetonitrile-water solution (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) containing 0.1% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA). The contents of the tubes were thoroughly mixed on a Vortex shaker until completely dissolved. The resulting solutions were applied to standard steel target plates for MALDI analysis based on the following protocol: 2 × 0.5 µl of the matrix solution and 5 × 0.5 µl of a protein sample solution (in order to concentrate it on the substrate as much as possible). The 2,5-dihydroxybenzoic acid solution at a concentration of 10 mg/ml in 10 mM sodium chloride (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) was used as the matrix. The mixtures were dried up in the air.

MALDI-TOF mass spectra of tryptic peptides were acquired on the Axima Resonance MALDI mass spectrometer (Shimadzu/Kratos Analytical Ltd., UK) in the range of 200-3000 m/z with mass accuracy of all measurements within 0.01 m/z unit, selecting the laser power which is optimal for achieving good results. The measurements were carried out in the positive ion mode.

Proteins were searched against the UniProt (SwissProt) database (<https://www.uniprot.org>) and the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) with a taxonomic restriction for the species *Homo sapiens* using the Mascot search engine (www.matrixscience.com) by peptide mass fingerprinting. Parallel search was performed using the database of inverted and random amino acid sequences (decoy). After the peptides were identified, the determined proteins were checked for their compliance with their actual positions on the strip.

Functional analysis

The established proteins were divided into groups depending on molecular function, cellular component, and biological process. It should be noted that such a division is largely arbitrary, since many of the proteins we have discovered show multiple functions in the cell, and in most cases, it corresponds to the division principle accepted in the SwissProt and NCBI databases.

The functions of proteins and their positions in the cell were also determined using the GeneGO database with the algorithms of the DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>). The resulting list of all functional groups, along with the data on the number of proteins in each group, was further processed by REVIGO (<http://revigo.irb.hr>), which simplifies long GO term lists by clustering similar groups and avoids the distribution of the same protein in different groups. Meanwhile, the identified proteins were compared with the data of MV proteomes from different sources using the Evida database algorithms (<http://evida.info>).

Results

The total protein content in the MVs produced by NK-92 cells was found to be $2.5 \pm 0.30 \mu\text{g}/10^6$ source cells. The data obtained subsequently allowed calculating the protein load of the strip for isoelectric focusing to obtain valid results.

During the isoelectrophoretic separation of the MV proteins, 24 fractions were obtained in the pH range from 3 to 10 with a step between fractions of approximately 0.3.

The MALDI-TOF mass spectrometric analysis determined a total of 986 proteins having a variety of functions.

Thus, the largest group of the proteins identified is represented by hypothetical proteins, proteins with unknown functions, and domains (117 entries). The most representative groups (comprising more than 40 proteins each) are also formed by transcription regulators; intracellular signaling proteins; RNA translation, transcription, processing, and utilization regulators; receptors; protein processing and proteolysis regulators; amino acid metabolism

enzymes, as well as transport proteins and transport regulatory proteins.

Minor functional groups (including less than 10 entries each) are represented by vitamin metabolism and mineral metabolism enzymes, membrane microdomain proteins, hormones, hemostatic regulators, sensory system proteins, specific mitochondrial and Golgi apparatus proteins, and intercellular signaling proteins.

The intermediate position (from 10 to 40 entries in each group) is occupied by various functional groups, including cytoskeleton and motor proteins; centriole proteins; ion channels and their regulators; proteins of the ubiquitin-proteasome system; lipid, steroid and fatty acid metabolism enzymes; nucleic acid base metabolism enzymes; carbohydrate metabolism enzymes, as well as energy metabolism enzymes and other proteins involved in intermediate metabolism; proteins of the immune response and inflammation; antigens and histocompatibility complex proteins; cytokines and growth factors; regulators of apoptosis, autophagy, endocytosis, and exocytosis; cell cycle and division regulators; cell proliferation and differentiation regulators; developmental proteins; cell adhesion and matrix proteins; nuclear transport proteins; transposition proteins; DNA replication and repair proteins, as well as inactive proteins.

The identified proteins were also distributed into functional groups by the DAVID GO analysis algorithm, the proteins showing a number of functions in the cell appearing simultaneously in several groups. The resulting list of 654 functional groups was further reduced using REVIGO. Thus, the most common groups were obtained, being distributed by molecular function (Fig. 1A), cellular component (Fig. 1B), and biological process (Fig. 1C).

The analysis of the identified proteins distributed by molecular function showed that the bulk of them is involved in protein (66%) and carbohydrate derivative (16%) binding, while the minor components altogether account for only 18% and include anion, carboxylic acid, magnesium ion, SNARE, syntaxin, GDP, and modified amino acid binding, as well as transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups, and anion channel activity (Fig. 1A).

The distribution of proteins by cellular component showed that the most representative (7-20%) groups include proteins of the intracellular part, organelles and membrane-bounded organelles, cytoplasm, nucleus, and macromolecular complex, while proteins of the mitochondrial part, entire membrane, and membrane protein complex, as well as anchoring and adherens junctions, are minor components, which account for only 9% of the total number of the identified proteins (Fig. 1B).

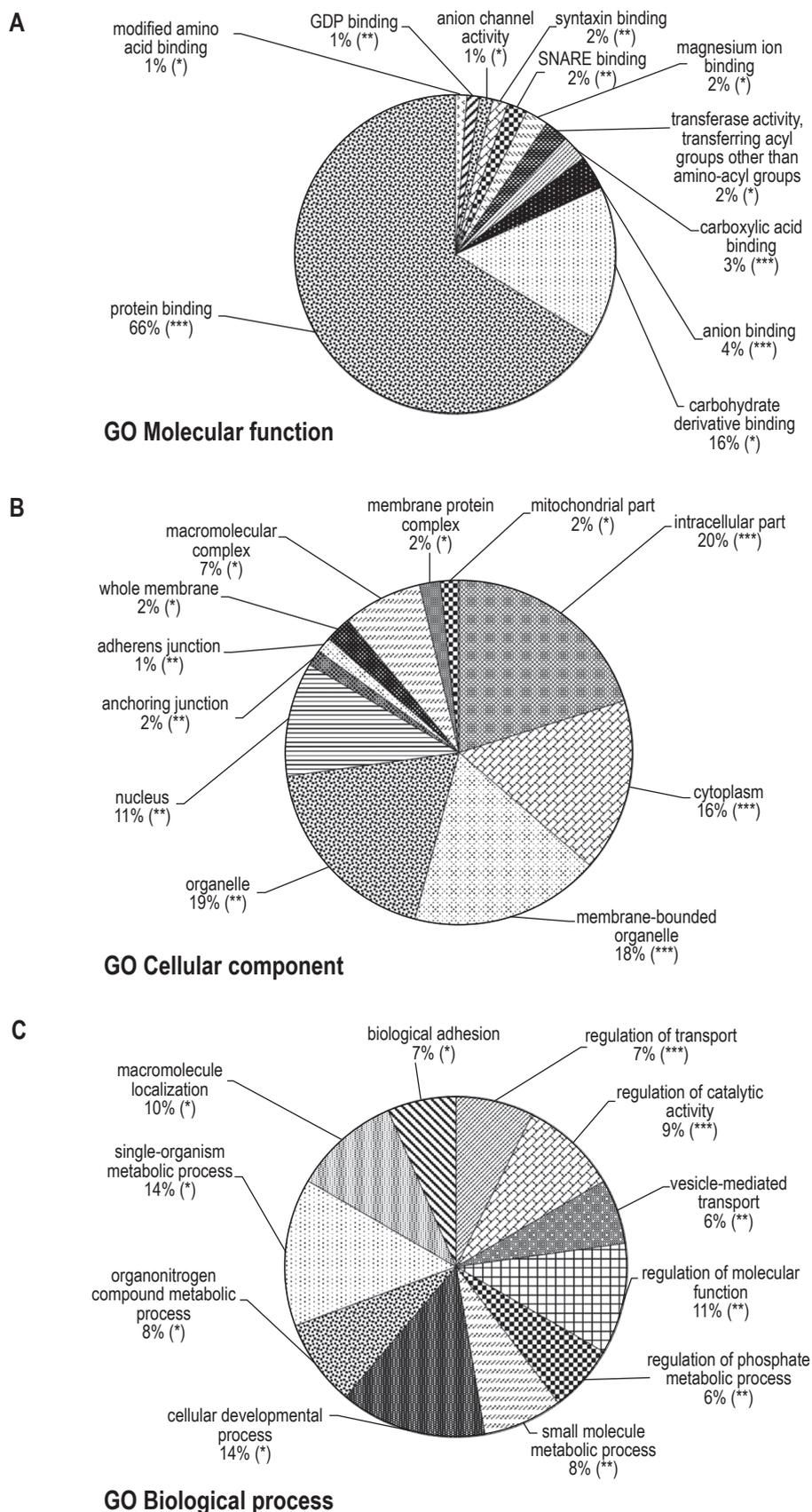


Figure 1. Functional groups of proteins obtained from lysates of microvesicles produced by the NK-92 natural killer cell line: A – molecular function; B – cellular component; C – biological process

Note. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.001$; DAVID 6.8 and REVIGO.

The functional groups distributed by biological process were found to be uniform, though. There are approximately equal proportions (10-14%) in the groups of proteins responsible for the cellular developmental and single-organism metabolic processes, and regulation of molecular function and macromolecule organization. The groups of proteins with slightly smaller fractions (6-9%) are represented by molecules involved in the regulation of catalytic activity, organonitrogen compound and phosphate metabolic process, and biological adhesion, as well

as the regulation of transport and vesicle-mediated transport (Fig. 1C).

Additionally, DAVID Functional Annotation Clustering analysis of the identified proteins was performed, combining similar functional groups into one cluster (in this case, all the proteins were counted, but not totalized). As in the case of the distribution by functional groups, the most common groups of the proteins were selected for the subsequent analysis, being distributed by molecular function (Fig. 2A), cellular component (Fig. 2B), and biological process (Fig. 2C).

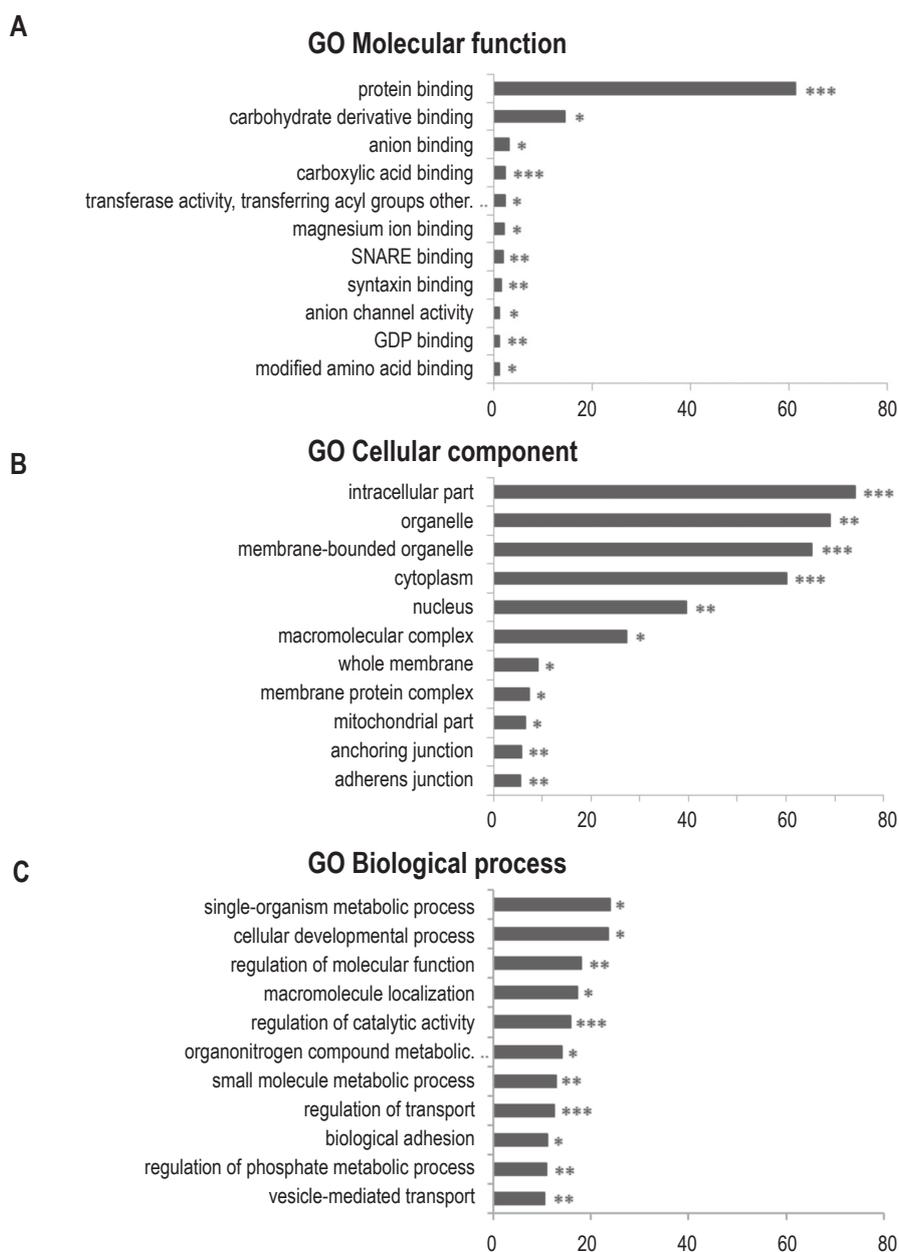


Figure 2. Most common clusters of proteins obtained from lysates of microvesicles produced by the NK-92 natural killer cell line: A – molecular function; B – cellular component; C – biological process

Note. Percentage of the total number of identified proteins. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.001$; DAVID 6.8.

In contrast to the clustering of GO terms by molecular function (Fig. 2A), which did not reveal significant discrepancies with the results of functional analysis (Fig. 1A), cluster annotation analysis of the identified proteins based on information about their biological function (Fig. 2C) revealed 1.5-2.0-fold higher fractions of the functional groups and even higher ones exceeding the data of functional analysis by 3.5-4.0 times, when the proteins were analyzed based on cellular component (Fig. 2B).

An analysis performed using the EVpedia database algorithms compared the currently known MV proteomes (produced by mesenchymal bone marrow stem cells, cerebral endothelial cells, glioblastoma, hepatocarcinoma, and blood platelets) with the data obtained in our study (Fig. 3). Thus, we were able to obtain another set of functional groups of the identified proteins that were significantly ($p < 0.001$) better represented in the MVs released from NK-92 cells.

It was shown that the main difference between the MVs produced by NK-92 cells and other sets of MVs was in metabolic peculiarities and cellular component organization or biogenesis (400-788 entries). The next most significant difference was the increased number of proteins involved in developmental process, cellular response to stimulus, multicellular organismal, and cell communication (227-355 entries). The smallest difference was revealed in the regulation of biological process, molecular function, and catalytic activity (98-139 entries).

Discussion

NK-92 cells used by us allow *in vitro* analyzing the main biochemical processes that occur in NK cells *in vivo*, including those leading to spontaneous secretion of MVs into the extracellular space. The data obtained using MALDI-TOF mass spectrometry indicate that the MVs produced by NK-92 cells are characterized by a wide range of proteins with various functions and properties, providing the possibility of multilateral regulation of cell metabolism.

In the last 10-15 years, international research teams studied in detail the proteome of NK cells with the CD56^{dim} or CD56^{bright} phenotype [15, 17, 26]. However, the most detailed of them only mentions approximately 3 000 proteins [26], which is significantly less than the number of proteins contained in any eukaryotic cell. That strongly indicates the incompleteness of the NK cell proteome described to date. Nevertheless, the main functional groups of proteins presented in the above work matched those found in our study. However, from the list of proteins presented in that work, only 120 entries (4.1%) matched those found by us in the MVs derived from the source cells. Meanwhile, the remaining 869 entries of the proteins identified by us in the MVs give a piece of new information on the NK-92 cell proteome.

In concordance with the biogenesis pathways of the studied MVs, their proteome constitutes a set of protein molecules of cellular origin. Proteomes of

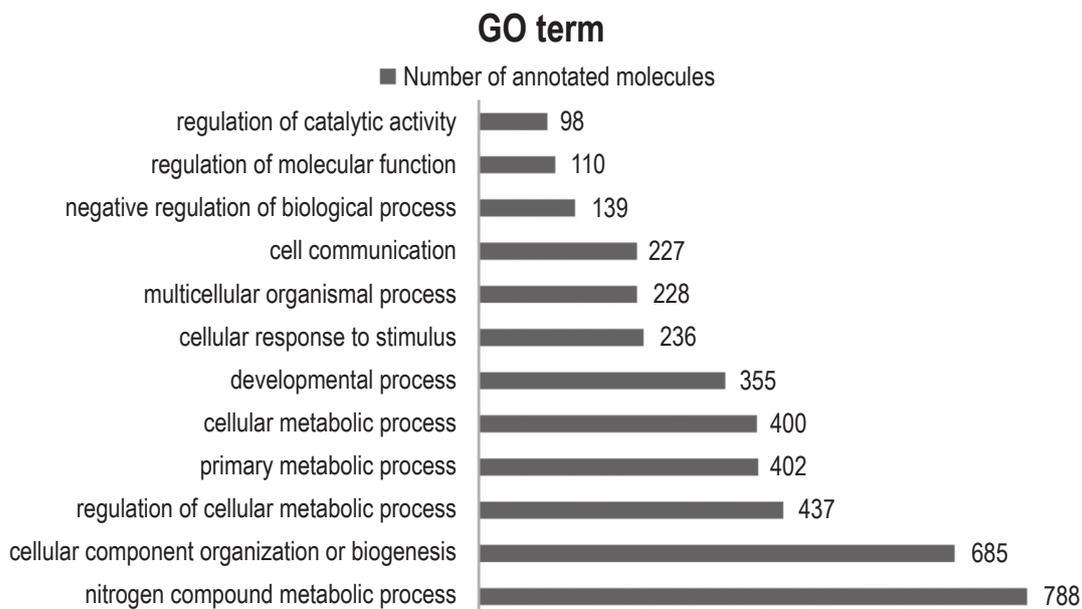


Figure 3. Specific functional groups of proteins obtained from lysates of microvesicles produced by the NK-92 natural killer cell line

Note. $p < 0.001$; EVpedia

MVs produced by platelets, mature lymphocytes, endotheliocytes, mast and some other types of cells are currently studied, and data from these studies are presented by a number of authors [9]. Thanks to these works, it is known that in MVs derived from blood and vascular cells, there are both non-specific proteins characteristic of any type of cells and specific proteins involved in the functioning of a particular cell. Proteins specific for cells of a certain type are, as has been shown, a T-cell receptor expressed primarily on T-lymphocytes, platelet P-selectin, and other proteins capable of being involved in the immune response. Regardless of their cellular origin, MV proteins, are most often involved in the formation of vesicles. Undoubtedly, such proteins are tetraspanins (CD9, CD63, CD81, and CD82), heat shock proteins (HSP70, HSP90), cytoskeletal elements, enzymes of various metabolic pathways, adhesion molecules, as well as proteins of the main histocompatibility complex (MHC) [30].

In the MVs studied by us, proteins belonging to the above classes were also found, in particular tetraspanin-32, chaperones, structural and motor proteins, numerous proteins involved in metabolism (those forming the cytoskeleton, along with enzymes involved in various metabolic pathways, constituted a more significant part of the identified proteome), alpha-catulin, cadherins, liprin, as well as proteins associated with the MHC. Besides, we identified some specific proteins, in particular those responsible for the implementation of the defense mechanisms, chemokines and cytokines, as well as their receptors, semaphorins, defensins, collectin, ficolin, interferon β , TGF- β , TNF ligands, growth factors, regulators of apoptosis (including granzyme A, a serine protease expressed in cytotoxic T-lymphocytes and NK cells), as well as specific nuclear proteins, which could not be quite expected in the studied MVs [34].

Among the proteins identified by us in the MVs produced by NK-92 cells, cytokines, receptors, and regulatory proteins (Table 1) should be especially distinguished for two reasons. First, most of them have been found in NK cells isolated from both tissues or peripheral blood and transplantable NK cell lines. Secondly, the expression of such proteins in the MVs can have a certain signaling or regulatory function in relation to target cells. For instance, the transfer of granzymes to target cells as part of the MVs can enhance the cytotoxicity of NK cells [28]. Cytotoxic protein granzyme A being found in the studied MVs can be accounted for by the fact that in the cell, granzymes are densely packed in membrane lytic granules, which then enter the MVs either in whole or in part and thus can participate in the attack on target cells.

We also identified galectin-3 in the MVs released from NK-92 cells. It was shown earlier that this protein expressed by tumor cells increases their viability and proliferation, and helps them suppress the cytotoxicity of NK cells by binding to the nkp30 receptor [39]. It could be possible that NK-92 cells can thus increase their viability and regulate their cytotoxic activity using negative feedback. It is also worth noting that transmission of cell surface receptors (CCR2, CCR3, CCR7, CD215, CD49f, CD16a, CD150, THRA, CD100, and CD252) from the MVs to target cells, as a result of the membrane fusion, can underlie the emergence of new characteristics in the target cells and play a role in tumor metastasis.

The detection of the MHC class II antigens (DQ), as well as the α and β subunits of the T-cell receptor, in the MVs produced by NK-92 cells was unexpected, despite the fact that it had been previously shown that individual subpopulations of NK cells could express the MHC class II molecules and T-cell receptors [37]. We also obtained data on the detection in the MVs of proteins not previously described in NK cells, for instance, CCR3, CD150, CXCL10 (found in mouse NK cells [27]), CXCL11, interferon β , interleukin-7, interleukin-12 (Table 1), and some others. These data must be validated later using the immunoblotting and (or) real-time polymerase chain reaction methods in both NK-92 cells and NK cells isolated from various tissues, as well as at different stages of differentiation of NK cells.

The data obtained by us on histones and histone-lysine N-methyltransferases, as well as a number of other specific nuclear proteins, represented in the studied MVs, indicate the presence of a small admixture of apoptotic bodies therein (or even MVs released from those apoptotic bodies), sizes of which (1000-5000 nm) can partially overlap with the MV dimensions (100-1000 nm) within the 1000 nm border region, rather than the presence of nuclear proteins in the fraction [32]. It should be noted that we succeeded in achieving reproducible results on granzyme A, histones, and a number of other proteins being identified in the studied MVs by two different methods of mass spectrometry [12].

There is literature data on granzymes being found in exosomes (40-150 nm) [16], while larger ectosomes mainly contain cytoplasmic isoforms of proteins. At the same time, there is evidence that large MVs may include other compartments and cell organelles [31]. Thus, the detection in the studied MVs of granzymes differentiated by size does not allow to unambiguously indicate the origin of these particles. In studying this issue, it might be useful to use, along with the approach presented by us, additional techniques, including the determination of specific exosomal proteins, for example, Alix, or, conversely, cytoplasmic membrane proteins. In this way, the question of the possible

TABLE 1. SEVERAL FUNCTIONS OF PROTEINS OF THE MICROVESICLES PRODUCED BY THE NK-92 NATURAL KILLER CELL LINE

Protein	Function	Presence in NK cells. References
CCR2	CCL2 (MCP-1) receptor, control of cell migration	[33]
CCR3	CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26, and CCL28 receptor	N/A
CCR7	CCL19 and CCL21 receptor, control of cell migration into the lymph node	[25]
Interleukin-15 receptor (IL-15ra, CD215)	IL-15 receptor, regulation of cell activity and proliferation	[3]
Integrin α 6 (CD49f)	integrin receptor, integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components (laminin, collagen, and fibronectin)	[6]
Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A (Fc-gamma RIII α , CD16a)	IgG receptor, antibody-dependent cell cytotoxicity	[23]
Prostaglandin E2 receptor EP4 subtype (EP4)	PGE2 receptor, inhibition of cell cytotoxicity	[5]
Signaling lymphocytic activation molecule (SLAMF1, CD150)	receptor found on NKT cells, differentiation, bacterial antigen binding	N/A
Thyroid hormone receptor α 1 (THRA)	T3 receptor, enhancing of cell cytotoxicity and response to IFN γ	[35]
Triiodothyronine receptor	same as Thyroid hormone receptor alpha 1 (THRA; according to https://www.uniprot.org)	
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MAP2K6)	intracellular signaling (the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK-signaling pathway), control of viability, control of activating receptor expression, inhibition of activated cell proliferation	[20]
Rho family GTPase 3 isoform CRA (RND3)	intracellular signaling, control of cytoskeletal rearrangement, control of interactions of actin filaments and microtubules in cell cytotoxicity implementation process	[19]
Tyrosine-protein kinase ITK/TSK (ITK)	intracellular signaling, cell cytotoxicity control	[10]
Tyrosine-protein kinase Lyn isoform 1 (LYN)	intracellular signaling, signaling via CD94 and NKR-P1, control of cell cytotoxicity	[24]
C-C motif chemokine 5 (CCL5, RANTES)	chemokine, inflammatory mediator	[13]
C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10, IP-10)	chemokine, inflammatory mediator control of cell migration	N/A
C-X-C motif chemokine 11 (CXCL11)	chemokine, inflammatory mediator, control of cell migration	N/A
Interferon β	cell activation	N/A
Interleukin-7	enhancing of cell viability	N/A
Interleukin-12	pro-inflammatory cytokine, cell activation	[38]
Semaphorin-4D isoform 1 (SEMA4D, CD100)	activated cell surface receptor, mediating of cell cytotoxicity by binding to CD72 on the target cell	[21]
Transforming growth factor β	control of cell activity, regulation of differentiation	[40]
Tumor necrosis factor ligand superfamily member 4 (TNFSF4, CD252)	activation of cytotoxicity	[14]
Serpin B5 isoform 1 (SERPINB5)	regulation of cell adhesion and apoptosis; inhibition of cell invasion, migration, and angiogenesis	N/A
Granzyme A	triggering of apoptosis	[7]
Galectin-3	enhancing of cell viability and proliferation, suppression of cell cytotoxicity	[1]

Note. N/A – information not available.

inclusion of other organelles or their parts in the MVs is still open.

The molecular mechanisms of MV formation suggest the inclusion therein of both components of the actin network adjacent to the cell membrane and other cytoskeletal elements. The data obtained using mass spectrometry suggest that the MVs isolated by us may have an ectosomal nature. Thus, we identified proteins of the actin-myosin and tubulin-dynein systems and regulators of the cytoskeleton dynamics (myosin and related factors ARF1, ARF3, and ARF4; tubulin, dynein, coronin, ezrin, gamma-parvin, profilin-3, rho-related GTP-binding protein RhoV, etc.) involved in MV formation and budding from the cell membrane [18]. Various isoforms of cytoskeletal proteins, as well as proteins of the mitochondria, endoplasmic reticulum, or Golgi apparatus that we identified, have not been found in exosomes according to the available literature [2, 4]. This assumption can also be attributed to the presence of a number of ion channels in the studied MVs. The presence of endosomal proteins therein (Ras-related proteins Rab-7a, -21, and -23; WASH complex, nexins, ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3, clathrin, etc.) can be accounted for by the fact that the mechanism of MV formation is similar to that of the formation of intraluminal vesicles and the same proteins are involved in the direct transport of molecules in MVs. However, it was previously shown that the cytotoxic protein granzyme A identified by us in the studied MVs is contained in the lytic granules of NK cells and is inactivated after it enters the cytoplasm, forming a complex with serpin, which we also identified [11].

Other proteins commonly found in MVs include cytoplasmic glycolysis and protein folding enzymes. The matrix of the MVs derives from the cytoplasm, which accounts for the presence of these proteins therein.

Thus, the communication function can be performed by both the already listed proteins and other proteins involved in signal transduction (protein kinases and their activators, small GTPase activating proteins, Wnt proteins, etc.).

In addition to the proteins characteristic of the MV proteome, some proteins that cannot belong to the studied structures (chondroadgerin, endothelin, erythropoietin, neurospecific proteins, hemostatic regulators, sensory system proteins, etc.) were found in the samples, indicating their possible contamination. The various isoforms of cytoskeletal keratin identified

by us may also indicate a contamination of the samples with cytokeratin, which is often detected by mass spectrometry in fractions that do not comply with its isoelectric point and molecular weight. Similarly, this protein has been found elsewhere by other researchers who analyzed a variety of biological material [22].

Functional and cluster annotation analyzes revealed the predominant molecular functions of the proteins identified in the MVs produced by NK-92 cells, and showed possible participation of these proteins in biological processes. Meanwhile, the comparison of the data obtained with known proteomes of other sets of MVs showed the distinctive features of the studied MVs.

To date, a number of good proteomic research strategies have been described that are based on a combination of different approaches and techniques. Unfortunately, protein identification is a rather complex multi-stage process and does not always lead to reproducible results. The scheme proposed in this study can lead to good results with a qualitative description of the protein profile of the MVs released from NK-92 cells. However, the search for the target protein using this approach causes considerable difficulties. For a more detailed analysis of the MV proteome using mass spectrometric methods, it would be advisable to include in the study additional preparation steps at the stage of the isolation of the MVs, such as ultracentrifugation and immunoprecipitation. It is also worth noting that Q-TOF mass spectrometry gives more accurate results, since it uses the MS/MS technique. At the same time, this method gives a lower protein entry yield than MALDI-TOF mass spectrometry.

Conclusion

The conducted study showed that the MVs produced by NK-92 cells, along with proteins universal for body cells, also contain granzyme A and other specific proteins of cytotoxic cells, with which these MVs contribute to the cytotoxic effect of NK cells. The data obtained can expand the understanding of the distant communication of cells and indicate a variety of interactions between NK and target cells, which are not limited to cytotoxic effects only. The presented results will be useful for further proteomic studies of MVs produced by cells involved in immunological tolerance, which is established both under physiological conditions and in the conditions of inflammation.

References

1. Brittoli A., Fallarini S., Zhang H., Pieters R.J., Lombardi G. "In vitro" studies on galectin-3 in human natural killer cells. *Immunol. Lett.*, 2018, Vol. 194, pp. 4-12.
2. Burbano C., Rojas M., Vasquez G., Castano D. Microparticles that form immune complexes as modulatory structures in autoimmune responses. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 267590. doi: 10.1155/2015/267590.

3. Cepero-Donates Y., Rakotoarivelo V., Mayhue M., Ma A., Chen Y.G., Ramanathan S. Homeostasis of IL-15 dependent lymphocyte subsets in the liver. *Cytokine*, 2016, Vol. 82, pp. 95-101.
4. Haraszti R.A., Didiot M.C., Sapp E., Leszyk J., Shaffer S.A., Rockwell H.E., Gao F., Narain N.R., DiFiglia M., Kiebish M.A., Aronin N., Khvorova A. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell. Vesicles*, 2016, Vol. 5, no. 1, 32570. doi: 10.3402/jev.v5.32570.
5. Holt D., Ma X., Kundu N., Fulton A. Prostaglandin E(2) (PGE (2)) suppresses natural killer cell function primarily through the PGE(2) receptor EP4. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2011, Vol. 60, no. 11, pp. 1577-1586.
6. Honorati M.C., Neri S., Cattini L., Facchini A. IL-17 enhances the susceptibility of U-2 OS osteosarcoma cells to NK cell lysis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, Vol. 133, no. 3, pp. 344-349.
7. Jaime P., Garcia-Guerrero N., Estella R., Pardo J., Garcia-Alvarez F., Martinez-Lostao L. CD56(+)/CD16(-) Natural killer cells expressing the inflammatory protease granzyme A are enriched in synovial fluid from patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, Vol. 25, no. 10, pp. 1708-1718.
8. Jong A.Y., Wu C.H., Li J., Sun J., Fabbri M., Wayne A.S., Seeger R.C. Large-scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells. *J. Extracell. Vesicles*, 2017, Vol. 6, no. 1, 1294368. doi: 10.1080/20013078.2017.1294368.
9. Keerthikumar S., Gangoda L., Gho Y.S., Mathivanan S. Exosomes and microvesicles. Methods in molecular biology. Ed. Hill A., Humana Press, 2017, pp. 189-196.
10. Khurana D., Arneson L.N., Schoon R.A., Dick C.J., Leibson P.J. Differential regulation of human NK cell-mediated cytotoxicity by the tyrosine kinase Itk. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 6, pp. 3575-3582.
11. Ko Y.H., Park S., Jin H., Woo H., Lee H., Park C., Kim K. Granzyme B leakage-induced apoptosis is a crucial mechanism of cell death in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Lab. Invest.*, 2007, Vol. 87, no. 3, pp. 241-250.
12. Korenevskii A.V., Milyutina Y.P., Zhdanova A.A., Pyatygina K.M., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Mass-spectrometric analysis of proteome of microvesicles produced by NK-92 natural killer cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, Vol. 165, no. 4, pp. 564-571.
13. Kumar D., Hosse J., von Toerne C., Noessner E., Nelson P.J. JNK MAPK pathway regulates constitutive transcription of CCL5 by human NK cells through SP1. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 2, pp. 1011-1020.
14. Kweon S., Phan M.T., Chun S., Yu H., Kim J., Kim S., Lee J., Ali A.K., Lee S.H., Kim S.K., Doh J., Cho D. Expansion of human NK cells using K562 cells expressing OX40 ligand and short exposure to IL-21. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 879. doi: 10.3389/fimmu.2019.00879.
15. Liu X.C., Liang H., Tian Z., Ruan Y.S., Zhang L., Chen Y. Proteomic analysis of human NK-92 cells after NK cell-mediated cytotoxicity against K562 cells. *Biochemistry Moscow*, 2007, Vol. 72, no. 7, pp. 716-727.
16. Lugini L., Cecchetti S., Huber V., Luciani F., Macchia G., Spadaro F., Paris L., Abalsamo L., Colone M., Molinari A., Podo F., Rivoltini L., Ramoni C., Fais S. Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 6, pp. 2833-2842.
17. Ma D., Cao W., Kapur A., Felder M., Scarlett C.O., Patankar M.S., Li L. Differential expression of proteins in naive and IL-2 stimulated primary human NK cells identified by global proteomic analysis. *J. Proteomics*, 2013, Vol. 91, pp. 151-163.
18. Mallocci M., Perdomo L., Veerasamy M., Andriantsitohaina R., Simard G., Martinez M.C. Extracellular vesicles: mechanisms in human health and disease. *Antioxid. Redox Signal.*, 2019, Vol. 30, no. 6, pp. 813-856.
19. Malorni W., Quaranta M.G., Straface E., Falzano L., Fabbri A., Viora M., Fiorentini C. The Rac-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 oversees NK cell-mediated activity by regulating the actin/microtubule interplay. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 8, pp. 4195-4202.
20. Manzini C., Vene R., Cossu I., Gualco M., Zupo S., Dono M., Spagnolo F., Queirolo P., Moretta L., Mingari M.C., Pietra G. Cytokines can counteract the inhibitory effect of MEK-i on NK-cell function. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 38, pp. 60858-60871.
21. Mizrahi S., Markel G., Porgador A., Bushkin Y., Mandelboim O. CD100 on NK cells enhance IFN γ secretion and killing of target cells expressing CD72. *PLoS ONE*, 2007, Vol. 2, no. 9, e818. doi: 10.1371/journal.pone.0000818.
22. Nawrot R., Barylski J., Schulze W.X. Incorrectly annotated keratin derived peptide sequences lead to misleading MS/MS data interpretation. *J. Proteomics*, 2013, Vol. 91, pp. 270-273.
23. Ochoa M.C., Minute L., Rodriguez I., Garasa S., Perez-Ruiz E., Inoges S., Melero I., Berraondo P. Antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC): immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol. Cell Biol.*, 2017, no. 4, pp. 347-355.
24. Oykhman P., Timm-McCann M., Xiang R.F., Islam A., Li S.S., Stack D., Huston S.M., Ma L.L., Mody C.H. Requirement and redundancy of the Src family kinases Fyn and Lyn in perforin-dependent killing of Cryptococcus neoformans by NK cells. *Infect. Immun.*, 2013, Vol. 81, no. 10, pp. 3912-3922.
25. Pesce S., Carlomagno S., Moretta A., Sivori S., Marcenaro E. Uptake of CCR7 by KIR2DS4(+) NK cells is induced upon recognition of certain HLA-C alleles. *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, 754373. doi: 10.1155/2015/754373.
26. Scheiter M., Lau U., van Ham M., Bulitta B., Grobe L., Garritsen H., Klawonn F., Konig S., Jansch L. Proteome analysis of distinct developmental stages of human natural killer (NK) cells. *Mol. Cell. Proteomics*, 2013, Vol. 12, no. 5, pp. 1099-1114.

27. Singh U.P., Singh S., Singh R., Cong Y., Taub D.D., Lillard J.W., Jr. CXCL10-producing mucosal CD4⁺ T cells, NK cells, and NKT cells are associated with chronic colitis in IL-10(-/-) mice, which can be abrogated by anti-CXCL10 antibody inhibition. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2008, Vol. 28, no. 1, pp. 31-43.
28. Sokolov D.I., Markova K.L., Mikhailova V.A., Vyazmina L.P., Milyutina Y.P., Kozyreva A.R., Zhdanova A.A., Malygina D.A., Onokhin K.V., Ivanova A.N., Korenevsky A.V., Selkov S.A. Phenotypic and functional characteristics of microvesicles produced by natural killer cells. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 669-688. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-669-688.
29. Sokolov D.I., Ovchinnikova O.M., Korenkov D.A., Viknyanschuk A.N., Benken K.A., Onokhin K.V., Selkov S.A. Influence of peripheral blood microparticles of pregnant women with preeclampsia on the phenotype of monocytes. *Transl. Res.*, 2016, Vol. 170, pp. 112-123.
30. Thery C., Zitvogel L., Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 2, no. 8, pp. 569-579.
31. Tramontano A.F., Lyubarova R., Tsiakos J., Palaia T., Deleon J.R., Ragolia L. Circulating endothelial microparticles in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.*, 2010, Vol. 2010, 250476. doi: 10.1155/2010/250476.
32. van der Pol E., Coumans F.A., Grootemaat A.E., Gardiner C., Sargent I.L., Harrison P., Sturk A., van Leeuwen T.G., Nieuwland R. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 12, no. 7, pp. 1182-1192.
33. van Helden M.J., Zaiss D.M., Sijts A.J. CCR2 defines a distinct population of NK cells and mediates their migration during influenza virus infection in mice. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 12, e52027. doi: 10.1371/journal.pone.0052027.
34. van Niel G., d'Angelo G., Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018, Vol. 19, no. 4, pp. 213-228.
35. Vasilopoulou E., Loubiere L.S., Lash G.E., Ohizua O., McCabe C.J., Franklyn J.A., Kilby M.D., Chan S.Y. Triiodothyronine regulates angiogenic growth factor and cytokine secretion by isolated human decidual cells in a cell-type specific and gestational age-dependent manner. *Hum. Reprod.*, 2014, Vol. 29, no. 6, pp. 1161-1172.
36. Veerman R.E., Gucluler Akpinar G., Eldh M., Gabrielsson S. Immune cell-derived extracellular vesicles – functions and therapeutic applications. *Trends Mol. Med.*, 2019, Vol. 25, no. 5, pp. 382-394.
37. Voigt J., Malone D.F.G., Dias J., Leeansyah E., Bjorkstrom N.K., Ljunggren H.G., Grobe L., Klawonn F., Heyner M., Sandberg J.K., Jansch L. Proteome analysis of human CD56^{neg} NK cells reveals a homogeneous phenotype surprisingly similar to CD56^{dim} NK cells. *Eur. J. Immunol.*, 2018, Vol. 48, no. 9, pp. 1456-1469.
38. Wagstaffe H.R., Nielsen C.M., Riley E.M., Goodier M.R. IL-15 promotes polyfunctional NK cell responses to influenza by boosting IL-12 production. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, no. 8, pp. 2738-2747.
39. Wang W., Guo H., Geng J., Zheng X., Wei H., Sun R., Tian Z. Tumor-released galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, no. 48, pp. 33311-33319.
40. Zhu L., Aly M., Kuon R.J., Toth B., Wang H., Karakizlis H., Weimer R., Morath C., Ibrahim E., Ekpoom N., Opelz G., Daniel V. Patients with idiopathic recurrent miscarriage have abnormally high TGFs⁺ blood NK, NKT and T cells in the presence of abnormally low TGFs⁺ plasma levels. *BMC Immunol.*, 2019, Vol. 20, no. 1, 10. doi: 10.1186/s12865-019-0290-3.

Авторы:

Корневский А.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель группы протеомной иммунорегуляции отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Щербицкая А.Д. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории сравнительной физиологии и патологии ЦНС ФГБНУ «Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия

Березкина М.Э. — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Korenevsky A.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Proteomic Immunoregulation Group, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Shcherbitskaya A.D., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Comparative Physiology and Pathology of the Central Nervous System, I. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Berezkina M.E., Research Assistant, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Александрова Е.П. — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Балабас О.А. — ведущий специалист Ресурсного центра «Методы анализа состава вещества» ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

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

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

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

Alexandrova E.P., Research Assistant, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Balabas O.A., Leading Specialist, Chemical Analysis and Materials Research Centre, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Поступила 20.03.2020
Отправлена на доработку 28.03.2020
Принята к печати 06.05.2020

Received 20.03.2020
Revision received 28.03.2020
Accepted 06.05.2020

IL-2 КАК РЕГУЛЯТОР УРОВНЕЙ СТРЕСС-ГОРМОНОВ И НЕЙРОТРОПНОГО ФАКТОРА BDNF ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

Фомичева Е.Е., Шанин С.Н., Филатенкова Т.А., Серебряная Н.Б.

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

Резюме. Экспериментальная черепно-мозговая травма (ЧМТ) вызывает устойчивую стресс-реакцию и изменяет экспрессию генов различных цитокинов и нейротрофических факторов. Целью настоящего исследования было определение изменений уровней гормонов кортикостерона, тестостерона и цитокина BDNF в сыворотке крови, а также экспрессии гена BDNF в гипоталамусе, для определения возможности коррекции развивающихся нарушений препаратом rIL-2. Использовали крысиную модель «падающего груза»: груз массой 115 г падал с высоты 80 см при моделировании легкой травмы и с высоты 120 см для нанесения травмы средней тяжести. После ЧМТ (непосредственно или через 72 часа) крысам ежедневно вводили рекомбинантный человеческий интерлейкин-2 (Ронколейкин) в дозе 30 мкг/кг, на курс 3 инъекции. Контрольным животным (также с ЧМТ) по той же схеме вводили 0,15 М NaCl. Определение концентрации кортикостерона, тестостерона и BDNF в крови проводили с помощью ELISA. Экспрессия гена BDNF в гипоталамусе определялась методом ПЦР-РВ. Эксперименты показали связь концентраций гормонов со степенью тяжести ЧМТ. При ЧМТ легкой степени пик кортикостерона в крови отмечали через 2 часа после травмы, а при ЧМТ средней тяжести пик концентрации кортикостерона был меньшим и отсроченным (через 24 часа). Концентрации кортикостерона и тестостерона реципрокно изменялись в обеих группах травмированных животных. При введении rIL-2 в обоих режимах отмечалось существенное повышение уровней кортикостерона и тестостерона. На 7 сутки после ЧМТ уровень BDNF в сыворотке крови достоверно снижался, но после введения rIL-2 в обоих режимах уровень BDNF повышался, при этом изменения были более выражены при введении rIL-2 сразу после ЧМТ. Интересно, что экспрессия гена BDNF в гипоталамусе на 7 сутки после ЧМТ повышалась только в случае введения rIL-2 через 72 часа после ЧМТ. Установленные в работе положительные ассоциации уровней BDNF и глюкокортикоидных гормонов при ЧМТ легкой степени, а также возможности координации этих параметров при введении rIL-2 при экспериментальной ЧМТ средней степени тяжести, позволяют предположить, что благоприятные эффекты rIL-2 на восстановительные процессы в ЦНС при ЧМТ частично опосредованы взаимным модулирующим воздействием BDNF и глюкокортикоидных гормонов.

Ключевые слова: экспериментальная черепно-мозговая травма, кортикостерон, тестостерон, BDNF, rIL-2

Адрес для переписки:

Серебряная Наталья Борисовна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 9а.
Тел.: 8 (812) 234-15-83.
Факс: 8 (812) 234-94-93.
E-mail: nbvma@mail.ru

Address for correspondence:

Serebryanaya Natalya B.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 9a.
Phone: 7 (812) 234-15-83.
Fax: 7 (812) 234-94-93.
E-mail: nbvma@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Е. Фомичева, С.Н. Шанин, Т.А. Филатенкова,
Н.Б. Серебряная «IL-2 как регулятор уровней
стресс-гормонов и нейротропного фактора BDNF
при экспериментальной черепно-мозговой травме»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4.
С. 647-656. doi: 10.15789/1563-0625-IAR-1973
© Фомичева Е.Е. и соавт., 2020

For citation:

E.E. Fomicheva, S.N. Shanin, T.A. Filatenkova,
N.B. Serebryanaya "IL-2 and regulation of stress hormones
and BDNF neurotropic factor levels after experimental
traumatic brain injury (TBI)", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 4,
pp. 647-656. doi: 10.15789/1563-0625-IAR-1973
DOI: 10.15789/1563-0625-IAR-1973

IL-2 AND REGULATION OF STRESS HORMONES AND BDNF NEUROTROPIC FACTOR LEVELS AFTER EXPERIMENTAL TRAUMATIC BRAIN INJURY (TBI)

Fomicheva E.E., Shanin S.N., Filatenkova T.A., Serebryanaya N.B.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Experimental traumatic brain injury (TBI) causes a stable stress response and changes the expression of various cytokine genes and neurotrophic factors. The goal of this study was to reveal changes in the levels of the corticosterone and testosterone hormones and the BDNF cytokine in blood serum, as well as the expression of the BDNF gene in hypothalamus in order to determine the opportunity of correcting the TBI damage with rIL-2. We used a rat model of “dropping load”: mild TBI was caused by falling of the 115 g load from the height of 80 cm, or 120 cm to produce a moderate-degree trauma. After TBI (immediately, or 72 hours later), the rats were injected daily with recombinant human interleukin-2 (Roncoleukin) at a dose of 30 µg/kg, a total of 3 injections. Control animals (also with TBI) received 0.15 M NaCl injections. Blood serum concentrations of corticosterone, testosterone, and BDNF were measured with ELISA tests. BDNF gene expression in hypothalamus was measured using RT-PCR. Results: the experiments showed a relationship between hormone concentrations and severity of head injury. In mild TBI, blood corticosterone levels reached a peak 2 hours after the injury, while in moderate TBI, the peak concentration of corticosterone was lower, being delayed in time (after 24 hours). Corticosterone and testosterone concentrations changed reciprocally in the both groups of injured animals. With injection of rIL-2 in both groups, corticosterone and testosterone levels were significantly increased. On day 7 after TBI, the BDNF level in blood serum was decreased, but it was raised in experimental group that received rIL-2. On day 7, the increase of BDNF gene expression in hypothalamus was more pronounced, when rIL-2 was administered at 72 hours after the head injury. The revealed positive association of BDNF levels and glucocorticoid hormones after mild TBI, like as possible coordination of these parameters with rIL-2 injection after experimental moderate TBI provides a reason to assume that the favorable impact of rIL-2 on the CNS recovery after TBI is, in part, mediated by the mutual modulating interaction of BDNF and glucocorticoid hormones.

Keywords: experimental traumatic brain injury, corticosterone, testosterone, BDNF, rIL-2

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из актуальных проблем современного здравоохранения и оценивается как «тихая эпидемия». Пациенты с повреждениями мозга различной степени тяжести часто страдают физическими и когнитивными нарушениями в течение многих месяцев и лет, а некоторые никогда не достигают полного выздоровления [16]. Для преодоления этих проблем необходим поиск эффективных лекарственных препаратов, облегчающих последствия ЧМТ и обеспечивающих восстановление функций центральной и периферической нервной системы в посттравматический период.

Согласно литературным данным, после ЧМТ в клетках микроглии мозга увеличивается экспрессия генов про- и противовоспалительных цитокинов и нейротрофических факторов, способствующих нейропротекции и восстановле-

нию после повреждения, таких как противовоспалительные цитокины (IL-1ra, IL-10, TGFβ) и нейротрофические факторы, включая фактор роста нервов (NGF), основной фактор роста фибробластов (FGF), нейротрофический фактор мозгового происхождения (BDNF) [16, 21]. Терапевтический потенциал нейротрофических факторов позволяет рассматривать эти цитокины в качестве нейропротекторов для лечения ряда неврологических заболеваний [5, 24].

Согласно клиническим наблюдениям, одним из цитокинов, способных уменьшать последствия травматического повреждения мозга и обладающих нейропротекторной и нейрорепаративной активностью при ЧМТ, является рекомбинантный IL-2, что, по-видимому, связано с его способностью усиливать синтез и выделение BDNF [7].

Как известно, IL-2 не только синтезируется клетками иммунной системы, но и производится

клетками головного мозга: белок IL-2 синтезируется нейронами головного мозга, а высокоаффинный рецептор к этому цитокину, содержащий альфа-цепь (CD25), экспрессируется на клетках микроглии. IL-2, являясь индуктором эффекторных реакций и клеток памяти, также поддерживает Treg-клетки, таким образом, он выполняет две разные функции, участвуя в регуляции различных этапов иммунных ответов [10]. Исследование роли IL-2 в формировании и поддержании Treg-клеток показало, что этот цитокин можно использовать для сдерживания неблагоприятных иммунных ответов и как иммунопротектор [20]. Для преимущественного или избирательного нацеливания IL-2 на клетки Treg в настоящее время разрабатываются режимы использования малых доз IL-2 при трансплантациях и лечении аутоиммунных заболеваний [31].

Поскольку любая серьезная травма приводит к устойчивой стресс-реакции, при ЧМТ индивидуальные изменения в продукции стресс-гормонов и реакции на них могут привести к разным посттравматическим исходам в связи с нарушением механизмов нейро-эндокринно-иммунного взаимодействия [6]. Важнейшей стресс-регулирующей системой является гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система (ГГАС). Своевременная активация ГГАС при стрессе и ЧМТ обеспечивает адекватную секрецию кортикостерона и противодействует развитию избыточного вторичного воспаления. Стресс также меняет активность гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы (ГГС), поскольку половые гормоны обладают нейропротективными свойствами в процессе адаптации при стрессе [1, 15]. В ЦНС тестостерон и его метаболиты выполняют роль нейростероидов, доказано их участие в формировании обучения, памяти и социально-поведенческой мотивации [3].

В работах многих авторов показана регуляторная роль глюкокортикоидных гормонов (ГК) и BDNF в патофизиологии ЧМТ, их связь с риском летального исхода, особенно среди молодых пациентов [13, 23]. Повышенный уровень ГК в ответ на стресс или ЧМТ может вызвать снижение синаптической пластичности, обусловленной подавляющим действием кортизола на экспрессию гена BDNF [24]. Регуляции уровней ГК и BDNF взаимосвязаны через множество механизмов, что проявляется при стрессе и ЧМТ [19, 27].

Целью настоящего исследования было определение изменений, развивающихся после экспериментальной ЧМТ и затрагивающих уровни гормонов кортикостерона, тестостерона и ростового фактора BDNF в сыворотке крови, а так-

же экспрессию гена BDNF в гипоталамусе, для определения возможности коррекции развивающихся нарушений препаратом rIL-2.

Материалы и методы

Работа выполнена на крысах-самцах породы Wistar массой 280-330 г. Животных содержали в условиях вивария при комнатной температуре с 12-часовым циклом свет/темнота, свободным доступом к воде и пище, на стандартной диете в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. Все процедуры с животными проводились в одно и то же время. В качестве модели механической травмы головного мозга использовали модель «падающего груза»: груз массой 115 г падал с высоты 80 см при моделировании легкой травмы и с высоты 120 см для нанесения травмы средней тяжести в центр теменной части головы животного [2]. Падение груза направлялось при помощи цилиндрической трубы с внутренним диаметром 20 мм, которая была жестко закреплена на штативе двумя держателями и центрирована над головой крысы. Расстояние между концом трубы и головой животного составляло 7 см. Установка для нанесения ЧМТ была собрана в отделе общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» на основе литературных сведений об установках для модели «падающего груза» [2]. Перед нанесением травмы животные получали наркоз из расчета 3-5 мл медицинского эфира на 1 кг массы тела в смеси с атмосферным воздухом. Эксперименты проводились в соответствии с требованиями нормативных документов, действующих в РФ, и регламентирующих гуманное обращение с животными при проведении медико-биологических исследований (№ 755 от 12.08.1977 г.). После нанесения травмы животных переносили в специальную пластиковую клетку, и за ними велось наблюдение вплоть до восстановления нормальных поведенческих паттернов.

При проведении исследования животным вводили коммерческий препарат дрожжевого рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Ронколейкин, ООО «БИОТЕХ», Санкт-Петербург, Россия). Видовые различия в данном случае не являются критическими, поскольку на нуклеотидном уровне в кодирующей области ген IL-2 человека и крысы имеет 72% гомологии, и белок сохраняет все основные типы активности, присущие данному цитокину [28]. После нанесения ЧМТ крысам ежедневно в течение 3-х дней внутрибрюшинно вводили rIL-2 (на курс – 3 инъекции) в дозе 30 мкг/кг массы животного, который разводили стерильным изотоническим

раствором хлорида натрия. Контрольным животным (также с ЧМТ) по той же схеме вводили 0,15 М NaCl в том же объеме и в те же дни.

Всего были сформированы следующие группы (по 5 животных): интактные крысы, крысы после ЧМТ (группа 1), крысы, которым вводили rIL-2 без ЧМТ (группа 2), крысы, которым вводили rIL-2 сразу после ЧМТ (группа 3), и животные, которым вводили rIL-2 через 72 ч после ЧМТ (группа 4).

На 7 и 14 сутки после нанесения ЧМТ и после окончания курса лечения rIL-2 животные выводились из эксперимента декапитацией: собирали кровь для тестирования содержания гормонов и уровня BDNF, выделяли мозг для постановки ПЦР в реальном времени (РВ).

Определение концентрации кортикостерона (Кс), тестостерона (Тс) и BDNF в крови животных проводилось с помощью ELISA, наборы фирмы DRG Diagnostic (Германия), согласно протоколу, предложенному фирмой-производителем. Экспрессия гена BDNF в гипоталамусе определялась методом ПЦР РВ при использовании набора реактивов фирмы Bio-Rad (США).

Статистическая обработка материалов исследования включала стандартное статистическое вычисление средних величин, их погрешностей, достоверность различий определяли с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Проведенные нами ранее исследования показали, что после ЧМТ существенно и разнонаправленно изменяются концентрации кортикостерона и тестостерона в крови животных: уровень Кс повышался через 2 часа после травмы с последующим его снижением ниже уровня интактных животных вплоть до 14 дня наблюдения. Напротив, уровень Тс через 2 часа после травмы достоверно снижался, но быстро возвращался к уровню интактных крыс [9].

В настоящем исследовании мы проанализировали динамику секреции Кс и Тс после ЧМТ у животных с травмой легкой и средней степени тяжести (рис. 1 и 2) и показали, что изменение концентрации гормонов зависели от степени тяжести ЧМТ. При ЧМТ легкой степени повышение уровня Кс в крови отмечали уже через 2 часа после травмы (пик с 4-кратным подъемом уровня гормона), что соответствовало типичной гормональной реакции на стресс (рис. 1). Однако далее у этих животных наблюдали длительное угнетение уровня Кс с его нормализацией только к 14 дню после травмы. При ЧМТ средней тяжести увеличение концентрации Кс через 2 часа после ЧМТ было достоверно меньшим и отсроченным (отмечались спустя 24 часа и далее), снижаясь до аномально низких величин вплоть до 14 дня наблюдения (окончания эксперимента). Такой

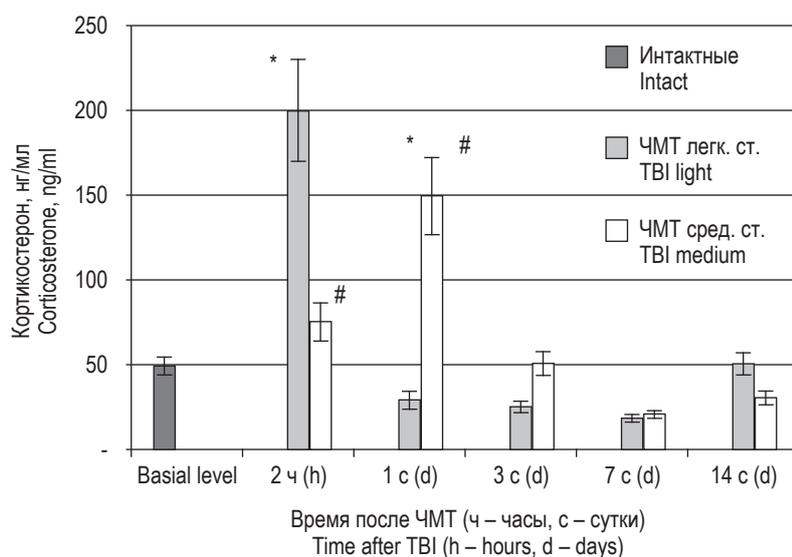


Рисунок 1. Концентрация кортикостерона (Кс) в сыворотке крови крыс после ЧМТ разной степени тяжести

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с уровнем гормонов у интактных животных; # – $p < 0,05$ по сравнению с уровнем Кс у животных с ЧМТ в те же сроки наблюдения.

Figure 1. Concentration of corticosterone (Cs) in the blood serum of rats after TBI of varying severity

Note. *, $p < 0.05$ compared with the basal level of hormones; #, $p < 0.05$ compared with the level of Cs in animals with TBI at the same time of observation.

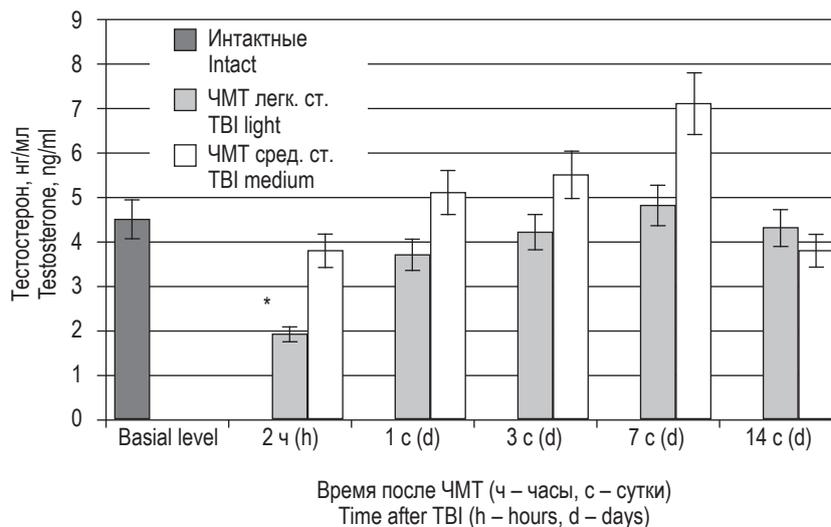


Рисунок 2. Концентрация тестостерона (Тс) в сыворотке крови крыс после ЧМТ разной степени тяжести
Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Concentration of testosterone (Ts) in the blood serum of rats after TBI of varying severity
Note. As for Figure 1.

тип ответа явно не соответствует оптимальному и определяется как медленное и недостаточное включение противовоспалительных реакций, так и как склонность к неэффективной регуляции воспаления [25]. Разный характер изменения эндогенного уровня Кс в крови животных с ЧМТ легкой и средней степени тяжести в первые и последующие сутки посттравматического периода может, по-видимому, рассматриваться как ранний маркер тяжести ЧМТ и иметь прогностическое значение.

Известно, что стресс у животных вызывает подавление синтеза тестостерона [15], причем продолжительность действия стрессора – определяющий фактор для снижения уровня этого гормона [4]. В нашем исследовании в группе животных с легкой травмой концентрация тестостерона снижалась в 2 раза через 2 часа после нанесения ЧМТ (рис. 2). Такая динамика уровня гормона типична для стрессорной реакции [6]. В последующие сроки уровни тестостерона не отличались достоверно от уровня этого гормона у интактных животных. При ЧМТ средней степени тяжести уровень тестостерона не снижался достоверно и оставался высоким (не отличающимся от нормального уровня) до 14 дня после ЧМТ. Сопоставление уровней кортикостерона и тестостерона свидетельствует о реципрокном изменении концентрации этих гормонов в обеих группах травмированных животных, что совпадает с данными других авторов [6, 15].

В следующей серии экспериментов работа проводилась на животных с ЧМТ средней степени тяжести для изучения возможности коррекции развивающихся нарушений. Животным после экспериментальной ЧМТ вводили gIL-2 по описанной схеме, начиная введение препарата или непосредственно после нанесения ЧМТ, или через 72 часа после нанесения ЧМТ. Представленные в таблице 1 данные свидетельствуют, что введение gIL-2 контрольным животным (без ЧМТ, группа 2) увеличивало концентрацию Кс в 2 раза по сравнению с уровнем гормона у интактных животных, что, по-видимому, обусловлено кортикотропным действием gIL-2 [32]. На 7 сутки после ЧМТ концентрация Кс в крови животных (1 группа) была снижена на 30% по сравнению с уровнем гормона у интактных животных. При введении травмированным животным gIL-2 непосредственно после ЧМТ или через 72 ч после ЧМТ (3 и 4 группы животных) отмечалось существенное повышение уровня Кс по сравнению с нелечеными крысами 1 группы. На 14 сутки концентрация Кс сохранялась повышенной в группе животных с ЧМТ и введением gIL-2 непосредственно после ЧМТ, в остальных группах возвращалась к показателям у интактных животных. Полученный результат может свидетельствовать об улучшении/нормализации стресс-реакций у травмированных животных.

Концентрация Тс незначительно возрастала у животных на 7 сутки после ЧМТ по сравнению с этим показателем у интактных животных и кон-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ СТРЕСС-ГОРМОНОВ И BDNF В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА BDNF В ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС ПОСЛЕ ЧМТ И ВВЕДЕНИЯ rIL-2 НЕПОСРЕДСТВЕННО ПОСЛЕ ЧМТ ИЛИ ЧЕРЕЗ 72 ЧАСА ПОСЛЕ ЧМТ

TABLE 1. THE SERUM CONCENTRATIONS OF STRESS HORMONES, BDNF, AND THE EXPRESSION OF BDNF GENE IN THE RAT HYPOTHALAMUS AFTER TBI AND rIL-2 ADMINISTRATION IMMEDIATELY AFTER TBI OR 72 HOURS AFTER TBI

Группы животных Groups of animals	Кортикостерон, нг/мл Corticosterone, ng/ml		Тестостерон, нг/мл Testosterone, ng/ml		BDNF, мкг/мл в сыворотке Serum BDNF, µg/ml		Экспрессия гена BDNF (отн. показатели BDNF/GADF) BDNF gene expression (relative BDNF/GADF)	
	7-е 7 th day	14-е 14 th day	7-е 7 th day	14-е 14 th day	7-е 7 th day	14-е 14 th day	7-е 7 th day	14-е 14 th day
Интактные крысы Intact rats	75,2±6,4		3,8±0,6		6,0±0,4		0,880±0,031	
Сутки после ЧМТ Day after TBI								
Группа 1 (ЧМТ) Group 1 (TBI)	50,6±4,2*	80,4±10,2	5,2±0,2	4,5±0,6	4,0±0,3*	6,0±0,9	0,83±0,04	0,86±0,04
Группа 2 (введение IL-2) Group 2 (administration of IL-2)	160,2±18,4#	120,3±15,6	5,9±0,4	4,0±0,5	8,2±1,0#	6,2±1,2	0,85±0,03	0,83±0,03
Группа 3 (ЧМТ + IL-2) Group 3 (TBI + IL-2)	180,3±20,0#	160,8±20,4#	9,0±0,8#	4,1±0,8	9,1±1,1#	6,9±0,9	0,81±0,03	0,81±0,03
Группа 4 (ЧМТ + IL-2 через 72 ч) Group 4 (TBI + IL-2 h after 72h)	300,6±50,2#	100,8±12,2	7,1±1,0#	3,7±0,7	6,3±1,2	7,0±1,0	0,89±0,02#	0,85±0,03

Примечание. * p < 0,05 – в сравнении с уровнем гормонов у интактных животных; # p < 0,05 – в сравнении с уровнем гормонов у животных, подвергнутых ЧМТ.

Note. * p < 0.05, compared with the level of hormones in intact animals; # p < 0.05, compared with the level of hormones in animals with TBI.

трольных, получавших только rIL-2, но существенно повышалась в группе животных после ЧМТ и введения rIL-2 (p < 0,05), осуществляемого как непосредственно после травмы, так и при начале курса rIL-2 через 72 часа после ЧМТ. К 14 суткам после ЧМТ гормональные показатели нормализовались во всех группах животных.

Измерение уровня BDNF в сыворотке крови животных также проводилось после нанесения

ЧМТ и введения rIL-2 в двух изучаемых режимах. Представленные в таблице 1 данные свидетельствуют, что на 7 сутки после ЧМТ уровень BDNF в сыворотке крови достоверно снижался (по сравнению с интактными животными), но в опытной группе, получавшей rIL-2 непосредственно после ЧМТ, и в контрольной группе, получавшей rIL-2 без ЧМТ, достоверно повышался. У животных, которым вводили rIL-2 через 72 часа

после ЧМТ, эффект был менее выраженным. На 14 сутки уровни BDNF в сыворотке крови соответствовали значениям у интактных животных во всех исследуемых группах.

Уровень экспрессии гена BDNF в гипоталамусе у животных после ЧМТ на 7 сутки наблюдения не изменялся по отношению к этому показателю у интактных животных (прослеживается только некоторая тенденция к его снижению). Повышение уровня экспрессии гена BDNF не наблюдали и после введения rIL-2 у животных без ЧМТ, а также у животных, получивших rIL-2 непосредственно после ЧМТ. Только в группе животных, получавших rIL-2 через 72 часа после ЧМТ, отмечено повышение экспрессии гена BDNF на 7-е сутки после травмы. На 14 сутки уровень экспрессии гена BDNF у животных опытных групп не отличался от этого показателя в группе интактных животных.

Обсуждение

Представленные данные об изменении уровня стресс-гормонов Кс и Тс после ЧМТ свидетельствуют, что характер выявленных изменений зависел от степени тяжести ЧМТ. Наблюдаемый при ЧМТ легкой степени краткосрочный выраженный подъем уровня Кс, по-видимому, соответствует оптимальной стресс-реакции, необходимой для преодоления последствий острого стресса и воспаления. Считается, что такое раннее включение противовоспалительных механизмов через активацию ГГАС позволяет сбалансировать про- и противовоспалительные сигналы и противодействовать развитию вторичного воспаления [4]. Напротив, наблюдаемый у животных, получивших ЧМТ средней степени тяжести, менее выраженный и отсроченный подъем уровня Кс мы расцениваем как недостаточно выраженный стресс-лимитирующий ответ.

Известно, что при стрессе активация ГГАС оказывает непосредственное влияние на ГГС, вступая с ней в реципрокные отношения. Недостаток секреции кортикостерона является причиной повышения секреции АКТГ, который сдвигает стероидогенез в сторону избыточного образования дезоксикортикостерона и угнетения продукции андрогенов [4, 6]. Проведенное нами исследование также подтверждает разнонаправленное и реципрокное изменение концентраций кортикостерона и тестостерона при стрессе, вызванном ЧМТ.

Стресс является также причиной изменения уровней IL-2 и его высокоаффинного рецептора, причем при легком стрессе концентрация данного цитокина и экспрессия его рецептора по-

вышаются, а при выраженном угнетаются [17]. По-видимому, недостаточность продукции IL-2 при стрессе и ЧМТ может приводить к угнетению синтеза и выделения BDNF с последующим снижением его концентрации в сыворотке крови и ЦСЖ. В то же время введение rIL-2 интактным животным приводило к выраженному увеличению концентрации BDNF в сыворотке крови.

У животных, перенесших ЧМТ средней степени тяжести, наблюдалось снижение уровня BDNF в сыворотке крови. Клинические наблюдения также свидетельствуют, что уровень рогового фактора BDNF достоверно снижался у лиц, получивших ЧМТ [14]. Интересно, что при анализе факторов риска смертности после ЧМТ у человека полиморфизм гена BDNF был определен как генетический фактор, связанный с прогнозом заболевания [5]. Кроме того, исследование больных с ЧМТ уточнило, что уровень BDNF снижался пропорционально тяжести повреждения и может быть использован как маркер тяжести и исхода заболевания [29]. В представленном нами эксперименте введение rIL-2 травмированным животным повышало концентрацию BDNF в сыворотке крови, причем изменения были особенно выражены у животных, получивших препарат сразу после ЧМТ (табл. 1). Таким образом, полученные нами данные подтверждают способность экзогенного IL-2 усиливать выделение BDNF, важнейшего цитокина, необходимого для успешной нейрорепарации [7].

В ряде исследований показано, что в условиях целостного организма имеются позитивные ассоциации между повышенными уровнями глюкокортикоидных гормонов и BDNF при стрессе и ЧМТ [11, 13]. Так, при стрессе у животных повышается концентрация BDNF и мРНК его высокоаффинного рецептора TrkB в гипоталамических ядрах, секретирующих кортикотропин-релизинг гормон (КРФ), что приводит к увеличению уровня мРНК КРФ в гипоталамусе [11]. Экспериментальные исследования других авторов показали, что внутрижелудочковое введение BDNF крысам индуцировало повышение концентрации КРФ в гипоталамусе, АКТГ в гипофизе и кортикостерона в крови через 30 минут после введения. При этом глюкокортикоидные гормоны могут ограничивать увеличение экспрессии BDNF после ЧМТ по механизму отрицательной обратной связи [23]. Такое ограничение необходимо, поскольку избыточное повышение уровня BDNF может приводить к повышению смертности больных после ЧМТ. Инверсия во взаимодействии глюкокортикоидов и BDNF отмечалась и в эксперименте у адреналэктомированных животных при

ЧМТ, когда уровень мРНК BDNF в гиппокампе значительно увеличивался. Заместительное введение кортикостерона предупреждало это нежелательное повышение уровня BDNF [23].

Таким образом, модуляция экспрессии BDNF и реактивности ГАКС при ЧМТ вовлечены в физиологический ответ и отражают гомеостатический процесс при стрессе и повреждении. Зарегистрированное в нашем исследовании повышение концентраций нейротропного фактора BDNF и кортикостерона после инъекций rIL-2 могут расцениваться как взаимосвязанные события, вовлеченные в процесс нейрорепарации после полученных повреждений. Клинические исследования свидетельствуют, что сывороточная концентрация BDNF коррелирует с тяжестью ЧМТ [30], и пациенты с легкими травмами имели самые высокие сывороточные уровни этого ростового фактора [18].

Источником BDNF в сыворотке крови могут быть как клетки мозга, так и периферические клетки [8, 12]. При исследованиях ЧМТ у человека о мозговой экспрессии BDNF косвенно можно судить по изменению концентрации данного цитокина в ЦСЖ. У здоровых лиц, как и у грызунов, уровни BDNF в сыворотке коррелируют с его уровнями в ЦСЖ [22, 26]. Однако при исследовании 203 больных с ЧМТ было показано,

что уровни BDNF в сыворотке и ЦСЖ в течение первой недели после тяжелой ЧМТ изменялись разнонаправленно: уровни BDNF в сыворотке были снижены, а уровни BDNF в ЦСЖ были немного увеличены [14]. В нашем исследовании о возможностях внутримозговой продукции BDNF судили по изменению экспрессии его гена в ткани гипоталамуса. Мы не выявили повышения уровня экспрессии гена BDNF как после введения rIL-2 животным без ЧМТ, так и на 7-е сутки после травмы у животных, получивших rIL-2 непосредственно после ЧМТ. Однако при введении rIL-2 животным через 72 часа после ЧМТ, экспрессия гена BDNF была повышена, что может приводить к повышению уровня цитокина в ткани мозга и ЦСЖ, как это показано в клинических наблюдениях [14].

Таким образом, установленные в работе положительные ассоциации уровней BDNF и глюкокортикоидных гормонов при ЧМТ, а также возможности координации этих параметров при введении rIL-2 при экспериментальной ЧМТ средней степени тяжести позволяют предположить, что благоприятные эффекты rIL-2 на восстановительные процессы в ЦНС при ЧМТ частично опосредованы взаимным модулирующим воздействием BDNF и глюкокортикоидных гормонов.

Список литературы / References

1. Бабичев В.Н. Нейроэндокринный эффект половых гормонов // Успехи физиологических наук, 2005. Т. 36, № 1. С. 54-67. [Babichev V.N. Neuroendocrine Effect Sex Hormones. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk = Advances in Physiology*, 2005, Vol. 36, no. 1, pp. 54-67. (In Russ.)]
2. Белошицкий В.В. Современные принципы моделирования черепно-мозговой травмы в эксперименте // Украинський нейрохірургічний журнал, 2008. № 4. С. 9-15. [Biloshytsky V.V. The principles of experimental traumatic brain injury modeling. *Ukrainiyskiy neyrokhirurgichniy zhurnal = Ukrainian Neurosurgical Journal*, 2008, no. 4, pp. 9-15. (In Russ.)]
3. Гончаров Н.П., Кацья Г.В., Нижник А.И. Дегидроэпиандростерон и функции мозга // Вестник РАМН, 2006. № 6. С. 45-50. [Goncharov N.P., Katsia G.V., Nizhnik A.N. Dehydroepiandrosterone and the cerebral functions. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2006, Vol. 74, no. 6, pp. 45-50. (In Russ.)]
4. Кубасов Р.В. Гормональные изменения в ответ на экстремальные факторы внешней среды // Вестник РАМН, 2014. № 9-10. С. 102-110. [Koubasov R.V. Hormonal changes in response to extreme environment factors. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2014, no. 9-10, pp 102-109. (In Russ.)]
5. Острова И.В., Аврущенко М.Ш. Экспрессия мозгового нейротрофического фактора (BDNF) повышает устойчивость нейронов к гибели в постреанимационном периоде // Общая реаниматология, 2015. Т. 11, № 3. С. 45-53. [Ostrova I., Avrushchenko M.Sh. Expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) increases the resistance of neurons to death in the postresuscitation period. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2015, Vol. 11, no. 3, pp. 45-53. (In Russ.)]
6. Рыбакина Е.Г., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Филатенкова Т.А., Дмитриенко Е.В. Клеточно-молекулярные механизмы изменения защитных функций организма при черепно-мозговой травме и попытка лечения // Медицинский академический журнал, 2014. Т. 14, № 4. С. 55-62. [Rybakina E.G., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Filatenkova T.A., Dmitrienko E.V. Cell-molecular mechanisms of protective function's changes under traumatic brain injury and ways for it's medication. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*, 2014, Vol. 14, no. 4, pp. 55-62. (In Russ.)]

7. Серебряная Н.Б., Липатова Л.В., Сивакова Н.А., Василенко А.В. Рекомбинантный интерлейкин IL-2 человека как агент антиэпилептической терапии // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 3. С. 723-726. [Serebryanya N.B., Lipatova L.V., Sivakova N.A., Vasilenko A.V. The recombinant human interleukin-2 (IL-2) as the agent of antiepileptic therapies. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 3, pp. 723-726. (In Russ.)]
8. Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П. Тромбоциты и нейровоспаление. Часть 1: Тромбоциты как регуляторы нейровоспаления и нейрорепарации // Цитокины и воспаление, 2017. Т. 16, № 4. С. 5-12. [Serebryanaya N.B., Shanin S.N., Fomicheva E.E. Platelets and neuroinflammation. Part I: platelets as regulators of neuroinflammation and neurorepair. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2017, Vol. 16, no. 4, pp. 5-12. (In Russ.)]
9. Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Филатенкова Т.А., Серебряная Н.Б. Коррекция нарушений нейроиммунных взаимодействий при экспериментальной черепно-мозговой травме препаратом рекомбинантного IL-2 // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 171-178. [Shanin S.N., Fomicheva E.E., Filatenkova T.A., Serebryanaya N.B. Correction of disturbed neuroimmune interactions in experimental traumatic brain injury by means of recombinant interleukin 2. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 171-178. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-171-178.
10. Abbas A.K., Trotta E., Simeonov D., Marson A., Bluestone J.A. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci. Immunol.*, 2018; Vol. 3, Iss. 25, pii: eaat1482. doi: 10.1126/sciimmunol.aat1482.
11. Alexander N., Osinsky R., Schmitz A., Mueller E., Kuepper Y., Hennig J. The BDNF Val66Met polymorphism affects HPA-axis reactivity to acute stress. *Psychoneuroendocrinology*, 2010, Vol. 35, Iss. 6, pp. 949-953.
12. Chacón-Fernández P., Säuberli K., Colzani M., Moreau T., Ghevaert C., Barde Y.-A. Brain-derived neurotrophic factor in megakaryocytes. *J. Biol. Chem.*, 2016, Vol. 291, no. 19, pp. 9872-9881.
13. de Assis G.G., Gasanov E.V. BDNF and Cortisol integrative system – plasticity vs. degeneration: implications of the Val66Met polymorphism. *Front. Neuroendocrinol.*, 2019, 55, 100784. doi: 10.1016/j.yfrne.2019.100784.
14. Failla M.D., Conley Y.P., Wagner A.K. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in traumatic brain injury-related mortality: interrelationships between genetics and acute systemic and central nervous system BDNF profiles. *Neurorehabil. Neural. Repair*, 2016, Vol. 30, no. 1, pp. 83-93.
15. Gray M., Bingham B., Viau V. A comparison of two repeated restraint stress paradigms on hypothalamic-pituitary-adrenal axis habituation, gonadal status and central neuropeptide expression in adult male rats. *J. Neuroendocrinol.*, 2010, Vol. 22, Iss. 2, pp. 92-101.
16. Hernandez-Ontiveros D.G., Tajiri N., Acosta S., Giunta B., Tan J., Borlongan C.V. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front. Neurol.*, 2013, Vol. 4, no. 30, pp. 1-9.
17. Himmerich H., Fischer J., Bauer K., Kirkby K.C., Sack U., Krügel U. Stress-induced cytokine changes in rats. *Eur. Cytokine Netw.*, 2013, Vol. 24, no. 2, pp. 97-103.
18. Kalish H., Phillips T.M. Analysis of neurotrophins in human serum by immunoaffinity capillary electrophoresis (ICE) following traumatic head injury. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2010, Vol. 878, Iss. 2, pp. 194-200.
19. Kamamura E., Numakawa T., Adachi N., Kunugi H. Glucocorticoid suppresses BDNF-stimulated MAPK/ERK pathway via inhibiting interaction of Shp2 with TrkB. *FEBS Letters*, 2011, Vol. 585, Iss. 20, pp. 3224-3228.
20. Liesz A., Suri-Payer E., Veltkamp C., Doerr H., Sommer C., Rivest S. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, pp. 192-199.
21. Loane D.J., Byrnes K.R. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*, 2010, Vol. 7, no. 4, pp. 366-377.
22. Morganti-Kossmann M.C., Yan E., Bye N. Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory? *Injury*, 2010, Vol. 41, Suppl. 1, pp. S10-S13.
23. Munoz M.J., Kumar R.G., Oh B.M., Conley Y.P., Wang Z., Failla M.D., Wagner A.K. Cerebrospinal fluid cortisol mediates brain-derived neurotrophic factor relationships to mortality after severe TBI: a prospective cohort study. *Front. Mol. Neurosci.*, 2017, Vol. 10, 44. doi: 10.3389/fnmol.2017.00044.
24. Numakawa T. Possible protective action of neurotrophic factors and natural compounds against common neurodegenerative diseases. *Neural Regen. Res.*, 2014, Vol. 9, Iss. 16, pp. 1506-1508.
25. Pearson-Murphy B.E. Glucocorticoids, Overview. *Encyclopedia of Stress (Second Edition)*. Ed. Fink G., Academic Press, 2007, pp. 198-210.
26. Pillai A. Decreased BDNF Levels in CSF of drug-naive first-episode psychotic subjects: correlation with plasma BDNF and psychopathology. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 2010, Vol. 13, Iss. 4, pp. 535-539.
27. Rothman S.M., Mattson M.P. Activity dependent stress-responsive BDNF signaling and the quest for optimal brain health and resilience throughout the lifespan. *Neuroscience*, 2013, Vol. 239, no. 3, pp. 228-240.
28. Saleem Basha N., Kewani Ghirmay, Melles Kahase. In silico comparison of interleukin-2 of Homo sapiens with different species. *Pharma Focus: The journal of Eritrean Pharmaceutical Association (ERIPA)*, 2011, Vol. 14, no. 10, pp. 32-37.
29. Schober M.E., Block B., Requena D.F., Hale M.A., Lane R.H. Developmental traumatic brain injury decreased brain derived neurotrophic factor expression late after injury. *Metab. Brain Dis.*, 2012, Vol. 27, no. 2, pp. 167-173.

30. Simon D., Nascimento R.I., Filho E.M., Bencke J., Regner A. Plasma brain-derived neurotrophic factor levels after severe traumatic brain injury. *Brain Inj.*, 2016, Vol. 30, Iss. 1, pp. 23-28.

31. Tahvildari M., Dana R. Low-dose IL-2 therapy in transplantation, autoimmunity, and inflammatory diseases. *J. Immunol.*, 2019, Vol. 203, Iss. 11, pp. 2749-2755.

32. Turnbull A.V., Rivier C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.*, 1999, Vol. 79, no. 1, pp. 1-71.

Авторы:

Фомичева Е.Е. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

Филатенкова Т.А. — научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Серебряная Н.Б. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Fomicheva E.E., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Filatenkova T.A., Research Associate, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Serebryanaya N.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 19.03.2020

Отправлена на доработку 24.03.2020

Принята к печати 06.05.2020

Received 19.03.2020

Revision received 24.03.2020

Accepted 06.05.2020

О СООТНОШЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЕЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ НА ОТДЕЛЬНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА В НОРМЕ И ПРИ СИСТЕМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Шишкин В.И.¹, Назаров П.Г.^{2,3}, Маленков Ю.А.¹, Шишкин В.В.¹,
Кудрявцева Г.В.¹, Картунен А.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

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

³ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель работы – выявить количественные соотношения, существующие между путями клеточной смерти в норме и при диффузной иммунокомплексной патологии.

Соотношение различных путей клеточной смерти (аутофагия, апоптоз, некроз) при аутоиммунных системных заболеваниях соединительной ткани (СЗСТ) – ревматоидном артрите (РА), системной красной волчанке (СКВ) и системной склеродермии (ССД) подвержено возрастным изменениям. С одной стороны, процесс старения можно рассматривать как генетически детерминированное общее снижение адаптивного потенциала организма и системную реакцию хронического возрастного воспаления, с выраженным цитокиновым провоспалительным сдвигом. С другой – в основе мультисистемности и полиорганности функционально-метаболических нарушений при системных заболеваниях соединительной ткани лежит полигенное снижение энергоинформационной емкости клеток.

Анализировали плазму крови у пациентов двух возрастных групп. Первую группу составили: 10 больных СКВ (4 мужчин и 6 женщин, средний возраст 43,8 года), 13 больных РА (5 мужчин и 8 женщин, средний возраст 45,6 года), 7 ССД (женщины, средний возраст 35,8 года) и 10 здоровых доноров (6 мужчин и 4 женщины, средний возраст 40,7 года). Вторую (возрастную) группу составили: 9 больных СКВ (2 мужчины и 7 женщин, средний возраст 69,8 года), 10 больных РА (5 мужчин и 5 женщин, средний возраст 65,6 года), 5 больных ССД (женщины, средний возраст 65,7 года) и 12 здоровых доноров (нормальное биологическое старение – 7 мужчин и 5 женщин, средний возраст 64,7 года).

Представленные в настоящей работе материалы получены при информированном согласии пациентов на участие. При проведении научных биомедицинских исследований пользовались международно признанным этическим стандартом – Хельсинкской декларацией Международной медицинской ассоциации 1996 года, пересмотренной в 2013 г.

Выявлено тесное взаимодействие между путями клеточной смерти при СЗСТ (наиболее ярко выраженное при СКВ), сопряженное с возрастными изменениями и клиническими проявлениями аутоиммунного процесса. При СЗСТ проявляются все типы клеточной смерти, однако степень их вы-

Адрес для переписки:

Шишкин Виктор Иванович
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
197375, Россия, Санкт-Петербург,
Университетская наб., 7/9.
Тел.: 8 (911) 913-96-17.
E-mail: visvi@mail.ru

Address for correspondence:

Shishkin Victor I.
St. Petersburg State University
197375, Russian Federation, St. Petersburg,
Universitetskaya emb., 7/9.
Phone: 7 (911) 913-96-17.
E-mail: visvi@mail.ru

Образец цитирования:

В.И. Шишкин, П.Г. Назаров, Ю.А. Маленков, В.В. Шишкин, Г.В. Кудрявцева, А.А. Картунен «О соотношении различных путей клеточной смерти на отдельных этапах онтогенеза в норме и при системных заболеваниях соединительной ткани» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 657-664. doi: 10.15789/1563-0625-RBV-1904
© Шишкин В.И. и соавт., 2020

For citation:

V.I. Shishkin, P.G. Nazarov, Yu.A. Malenkov, V.V. Shishkin, G.V. Kudryavtseva, A.A. Kartunen "Relationship between various pathways of cellular death at distinct stages of ontogenesis in normal state and systemic diseases of connective tissue", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 657-664. doi: 10.15789/1563-0625-RBV-1904
DOI: 10.15789/1563-0625-RBV-1904

раженности находится в зависимости от нозологической формы заболевания. Аутофагия в развитии системной диффузной патологии соединительной ткани (особенно в случае СКВ, а также РА) принимает непосредственное участие в формировании иммунного ответа и воспалительного процесса. При нормальном биологическом старении, так же как и при СЗСТ, наблюдается резкое возрастание активности метаболического триггера – аденозинмонофосфат-активированной протеинкиназы (АМРК) (сенсора внутриклеточной энергии), а также: смещается кислотно-щелочное равновесие, возрастает количество активных форм кислородных радикалов, изменяется red-ox потенциал клеток, идет активация компонентов клеточной деструкции, нарушается деятельность цитокиновой системы организма (цитокины – регуляторы апоптоза), снижается экспрессия шаперонов и смещается иммуно-оксигеназный гомеостаз. Ингибирование генетически детерминированного процесса гибели клеток – апоптоза – лежит в основе развития аутоиммунных заболеваний. Поздний апоптоз, протекающий во вторичный некроз, сопровождается снижением антиоксидантной защиты, развитием аутоиммунной патологии. Шаперон-опосредованная индукция иммунного ответа как сигнальный механизм аутофагии, закрепленный эволюционно только у млекопитающих, возможно, является общим центральным звеном и «молекулярным переключателем», вызывающим развитие как аутоиммунных заболеваний соединительной ткани, так и геронтологических процессов.

Ключевые слова: аутофагия, апоптоз, некроз, системная красная волчанка, системная склеродермия, ревматоидный артрит

RELATIONSHIP BETWEEN VARIOUS PATHWAYS OF CELLULAR DEATH AT DISTINCT STAGES OF ONTOGENESIS IN NORMAL STATE AND SYSTEMIC DISEASES OF CONNECTIVE TISSUE

Shishkin V.I.^a, Nazarov P.G.^{b,c}, Malenkov Yu.A.^a, Shishkin V.V.^a,
Kudryavtseva G.V.^a, Kartunen A.A.^a

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

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

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

Abstract. The aim of our research was to reveal quantitative ratios existing between the pathways of cellular death in normal state, as well as in immunocomplex pathology. The proportion of different pathways of cell death (autophagy, apoptosis, necrosis) in autoimmune (systemic connective tissue diseases (SDCT) – rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE) and systemic scleroderma (SSD) is a subject of age-related changes. On the one hand, aging process can be considered a genetically determined overall decrease in adaptive potential of the body, and a systemic age-related chronic inflammatory response, with a pronounced cytokine proinflammatory shift. On the other hand, a polygenic decrease in energy and information capacity of the cells, represent the basis of multisystem and multiorgan functional and metabolic disorders in SDCT.

Blood plasma samples were analyzed in the patients of two age groups. The first group consisted of 10 SLE cases (4 men and 6 women, average age 43.8 years), 13 patients with RA (5 men and 8 women, average age 45.6 years), 7 SSD (women, average age 35.8 years), and 10 healthy donors (6 men and 4 women, average age 40.7 years). The second age group consisted of 9 SLE cases (2 men and 7 women, average age 69.8 years), 10 patients with RA (5 men and 5 women, average age 65.6 years), 5 patients with SSD (women, average age 65.7 years) and 12 healthy donors (normal biological aging – 7 men and 5 women, average age 64.7 years). The data presented in this paper were obtained with informed consent of the patients. When carrying out biomedical research, we followed internationally recognized ethical standards of the Helsinki Declaration (International Medical Association, 1996, revision 2013). The proportion of various cell death types (autophagy, apoptosis, necrosis) in autoimmune disorders (systemic diseases of connective tissue, SDCT), i.e., rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE), and systemic scleroderma (SSD) proved to be subject to age-dependent changes. Close interaction were revealed between the ways of cellular death in SDCT (most pronounced in SLE), correlating with age changes and clinical manifestations of autoimmune process. In SDCT, the affected tissues exhibit all types of cellular death, however, degree of their expression depends on the disease nosology. Upon systemic diffuse pathology of connective tissue, autophagy (especially in case of SLE and RA) is directly involved in development of immune response and inflammatory process.

In normal biological aging, like as in SDCT, one may observe a sharply increased activity of the metabolic trigger – AMP-activated protein kinase (AMPK), a sensor of intracellular energy, along with shifted acid-base

equilibrium. The quantity of active oxygen radicals increases, oxidoreductive potential of the cells is changed, with activation of cellular destruction components. Activity of cytokine system in the organism is changed causing apoptosis regulation; expression of chaperons is decreased, and the immune-oxygenase homeostasis is also displaced. Inhibition of genetically determined process of death of cells (apoptosis) comprises the basis for development of autoimmune diseases. Transition of late apoptosis into secondary necrosis is accompanied by decrease of antioxidant protection and development of autoimmune pathology. The chaperon-mediated induction of immune response as the signaling mechanism of autophagy, being evolutionarily fixed in mammals only, may be the common central link and “the molecular switch” causing both development of autoimmune diseases of connective tissue, and aging processes.

Keywords: autophagy, apoptosis, necrosis, systemic disease, lupus erythematosus

Введение

Вопрос о соотношении основных механизмов клеточной смерти при изучении аутоиммунной патологии, развивающейся при системных заболеваниях соединительной ткани в процессе старения организма, до настоящего времени остается актуальным и полностью не расшифрованным. С одной стороны, процесс старения можно рассматривать как генетически детерминированное общее снижение адаптивного потенциала организма и системную реакцию хронического возрастного воспаления с выраженным цитокиновым провоспалительным сдвигом [1]. С другой — в основе мультисистемности и полиорганнысти функционально-метаболических нарушений при системных заболеваниях соединительной ткани лежит полигенное снижение энерго-информационной емкости клеток.

Критически важной в плане лечения СЗСТ у пациентов разных возрастных групп является оценка степени дисфункции гепатоцитов, основанная на определении активности органоспецифического фермента печени — сорбитолдегидрогеназы (СДГ) — на фоне процессов внутриклеточной детоксикации и аутофагии.

Открываются все новые составляющие, характеризующие возрастную специфику диффузных нейроиммуноэндокринных изменений в тканях [1, 6, 7]. Однако не делается попыток связать имеющиеся фактические материалы с тераностикой старения и особенностями развития комплексной аутоиммунной патологии при старении, а также оценить вклад в этот процесс механизмов клеточной смерти (аутофагия, апоптоз, некроз), определяющих в конечном счете реакции патологического гистогенеза [2, 3, 4, 5] в развитии иммунопатологического процесса при системных заболеваниях соединительной ткани.

Материалы и методы

Представленные в настоящей работе материалы получены при информированном согласии пациентов на участие. При проведении научных биомедицинских исследований пользовались международно признанным этическим стандар-

том — Хельсинкской декларацией Международной медицинской ассоциации 1996 года, пересмотренной в 2013 году.

Анализировали плазму крови у пациентов двух возрастных групп. Первую группу составили 10 больных системной красной волчанкой (СКВ) (4 мужчин и 6 женщин, средний возраст $43,8 \pm 2,2$ года), 13 больных ревматоидным артритом (РА) (5 мужчин и 8 женщин, средний возраст $45,6 \pm 2,7$ года), 7 больных системной склеродермией (ССД) (женщины, средний возраст $35,8 \pm 4,6$ года) и 10 здоровых доноров (6 мужчин и 4 женщины, средний возраст $40,7 \pm 3,4$ года). Вторую (возрастную) группу составили 9 больных СКВ (2 мужчины и 7 женщин, средний возраст $69,8 \pm 4,2$ года), 10 больных РА (5 мужчин и 5 женщин, средний возраст $65,6 \pm 5,2$ года), 5 больных ССД (женщины, средний возраст $65,7 \pm 5,6$ года) и 12 здоровых доноров (нормальное биологическое старение — 7 мужчин и 5 женщин, средний возраст $64,7 \pm 4,7$ года).

Уровень ионов кальция регистрировали методом атомной абсорбционной спектрофотометрии на атомном абсорбционном спектрофотометре Hitachi-207 (Япония). Активность аденозинмонофосфат-активированной протеинкиназы (АМПК) оценивали методом Western blotting.

По уровню суммарной АТФ-азной активности, определяемой спектрофотометрически, судили косвенно о метаболической динамике семейства белков-шаперонов HSP60 — HSP100. Уровень белка p53 анализировали иммуноферментным методом с использованием набора “Human p53 Platinum ELISA” (eBioscience, США). Оценку содержания 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-OH-dG) проводили иммуноферментным методом с использованием набора “8 hydroxy-2-deoxyGuanosine EIA Kit” (Cayman Chemical, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Количественное определение цитохрома С (Cyt c) осуществляли иммуноферментным методом с использованием набора “Human Cytochrome c Platinum ELISA” (eBioscience, США).

Активность сорбитолдегидрогеназы (SDG) определяли спектрофотометрически.

Регистрацию активных форм кислорода проводили при помощи метода электронного парамагнитного резонанса.

Уровень адениловых нуклеотидов оценивали хроматографически.

Содержание белка в плазме крови определяли при помощи коммерческого набора препаратов "Nano Orange Protein Quantitation kit" (Invitrogen, США) согласно прилагаемой прописи фирмы.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного пакета Statistica 6.0 for Windows.

Результаты и обсуждение

Аутофагия, как процесс эволюционно консервативный, принимающий непосредственное участие в формировании иммунного ответа [10, 18] и определяющий динамику и патогенез диффузных болезней, протекает с различной скоростью при СКВ, РА и ССД и зависит от возраста пациентов (табл. 1). Очевидное объяснение этому заключается в системности, полиорганности, степени остроты и выраженности полисиндромного процесса при этих ревматологических заболеваниях, что определяется эндоэргичностью воспалительных и иммунных реакций, лежащих в их основе [19] и проявляющих выраженную возрастную динамику. Так, функциональная активность АМПК (фермента, являющегося, по сути, сенсором внутриклеточной энергии и метаболическим маркером аутофагии, а также специфическим индикатором окислительно-восстановительного потенциала клетки) проявляется при СЗСТ особенно ярко у пациентов первой группы при СКВ и РА, превышая уровень нормы в 6,8 и 5,2 раза соответственно. С возрастом активность АМПК увеличивается, но на фоне СКВ и РА она превышает норму в среднем только в 2 раза.

Нарушение процессов шаперон-зависимого фолдинга белков, деструкция тканевых структур и клеточных органелл в процессе старения и при ревматологических заболеваниях сопровождаются выходом в кровяное русло митохондриальных изоферментов [16, 18]. Деэнергизация клеток при старении, усугубляющаяся на фоне системных заболеваниях соединительной ткани, нарастающего разобщения процессов дыхания с окислительным фосфорилированием, приводит к выходу из митохондрий проапоптотического белка межмембранного пространства — цитохрома С, повышенное содержание которого отражает апоптотическую гибель клеток по митохондриальному пути и свидетельствует о сравнительном нарастании гипоксии при старении и на фоне развития СКВ и РА (табл. 1).

Окислительный стресс при аутоиммунных заболеваниях соединительной ткани сопровождается кальциурией и нарастанием уровня кальция

в крови, что отражает степень тяжести остеопороза, в особенности при СКВ. Нарушение нормального гомеостаза свободного ионизированного кальция на фоне СЗСТ является сигнальным механизмом запуска апоптотического митохондриального каскада [8, 11, 17] (табл. 1).

Белки-шапероны (HSP), присутствующие не только в цитоплазме клеток, но также во внеклеточном пространстве и биологических жидкостях человека, играют ключевую роль в переключении программ гибели клеток [3, 12, 18]. Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что АТФ-азная активность семейства шаперонов HSP60 — HSP100 с возрастом снижается. При этом выход цитохрома С из митохондрий при старении организма увеличивается (табл. 1). Следовательно, у возрастной группы пациентов (группы № 2) по сравнению с первой группой тормозится процесс передачи апоптотического сигнала и снижается протекторная шаперонная активность, наиболее выраженная при СКВ и РА. Являясь биологическими маркерами неблагоприятного состояния организма, HSP ориентированы на поддержание функционально компетентного конформационного гомеостаза белков [5]. Очевидно, что старение организма снижает остроту иммунопатологического процесса при СЗСТ, при этом отмечается некая общность его развития, наиболее ярко проявляющаяся при СКВ. Важно, что при этом уровень белка p53 — важнейшего опухолевого супрессора и биомаркера апоптоза (циркулирующего между ядром и цитоплазмой, который экспрессируется при деструкции ДНК, отражает более высокую степень окислительного повреждения ДНК, увеличивает экспрессию гена, кодирующего лизосомальные мембранные белки, индуцирующие макроаутофагию и выраженность окислительного стресса) — значительно увеличивается с возрастом и на фоне развития именно СКВ и в меньшей степени при РА и ССД (табл. 1) [17]. Об этом свидетельствуют также данные по определению уровня 8-ОН-dG как биомаркера свободно-радикального повреждения ДНК и данные по определению уровня активных форм кислородных радикалов (табл. 1, 2).

Аутофагия при СКВ и РА принимает непосредственное участие в развитии иммунного ответа и воспалительного процесса особенно у пациентов группы 43-45 лет: наблюдается резкое возрастание активности метаболического триггера — АМПК (сенсора внутриклеточной энергии), а также: смещается кислотно-щелочное равновесие, возрастает количество активных форм кислородных радикалов, изменяется редокс потенциал клеток гепатоцитов. Отметим, что смещение рН крови (в среднем от 7,5 в норме до 6,7 при СКВ) и окислительный стресс включают синтез шаперонов. Уровень адениловых нуклео-

ТАБЛИЦА 1. НЕКОТОРЫЕ МАРКЕРЫ АУТОФАГИИ, АПОПТОЗА И НЕКРОЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С СЗСТ (M±m)

TABLE 1. SOME MARKERS OF AUTOPHAGY, APOPTOSIS AND NECROSIS IN THE BLOOD SERUM OF HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH SDCT (M±m)

Группа № 1 Group No. 1	АМРК (усл. ед./мг белка) АМРК (cond. unit/mg protein)	АТФ-азная активность (нМ Ф неорг./ мин·мг белка) АТP-ase activity (nM P _i /min·mg protein)	Уровень ионов кальция (мМ) Ca-ion level (mM)	Цитохром С (нг/мл) Cyt c (ng/ml)	p 53 (нг/мл) p 53 (ng/ml)	8-ОН-dG (нг/мл) 8-OH-dG (ng/ml)
Норма (10) Norm	1,6±0,4	4,4±0,5	2,85±0,56	13,4±0,4	0,87±0,09	14,5±1,4
СКВ (10) SLE	10,8±0,3***	9,7±0,3**	3,79±0,19*	43,7±1,9***	1,63±0,07*	31,9±3,4**
РА (13) RA	8,3±0,6***	8,9±0,2*	3,28±0,17*	31,3±4,7**	1,37±0,06*	25,2±2,9*
ССД (7) SSD	3,8±0,6**	6,1±0,4*	2,51±0,24	16,9±2,9	0,88±0,04	19,7±3,8*
Группа № 2 Group No. 2						
Норма (12) Norm	4,4±0,3	2,1±0,3	2,12±0,56	20,9±0,7	1,57±0,23	24,5±1,9
СКВ (9) SLE	8,8±0,6**	4,7±0,3*	3,72±0,15*	58,8±4,3***	2,99±0,07*	39,8±3,7*
РА (10) RA	6,6±0,7*	3,9±0,2*	3,19±0,06*	49,3±4,6**	1,97±0,08	29,6±2,4
ССД (5) SSD	4,8±0,5	2,9±0,4	2,58±0,21	28,6±5,9*	1,88±0,04	25,7±3,9

Примечание. СЗСТ – системные заболевания соединительной ткани; АМРК – 5'АМФ-активируемая протеинкиназа; p53 (белок p53) – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл; 8-ОН-dG – 8-гидрокси-2-деоксигуанозин; СКВ – системная красная волчанка; РА – ревматоидный артрит; ССД – системная склеродермия. Различия со здоровыми лицами соответствующей группы: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001.

Note. CDST, connective tissue diseases; АМРК, 5'AMP activated protein kinase; Cyt c, cytochrome c; p53 (protein p53), transcription factor regulating cell cycle; 8-OH-dG, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine; SLE, systemic lupus erythematosus; RA, rheumatoid arthritis; SSD, systemic scleroderma. Differences with healthy individuals of the corresponding group: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

тидов при этом закономерно изменяется: значительно увеличивается содержание АМР, снижается АДФ и АТФ, особенно резко при СКВ [19]. Биохимические механизмы развития воспалительных и иммунных процессов при системных заболеваниях соединительной ткани требуют высоких энергозатрат. Блокирование аутофагии приводит к накоплению в цитоплазме поврежденных митохондрий, супероксидных анионов, развитию генерализованного иммуно-воспалительного процесса [6, 9, 12]. Именно аутофагия в развитии системной диффузной патологии соединительной ткани (особенно в случае СКВ, а также РА) принимает непосредственное участие в формировании иммунного ответа и развитии воспалительного процесса. Наблюдается

резкое возрастание активности метаболического триггера – АМРК (сенсора внутриклеточной энергии), а также: смещается кислотно-щелочное равновесие, возрастает количество активных форм кислородных радикалов, изменяется ред-ox потенциал клеток, идет активация компонентов клеточной деструкции, нарушается деятельность цитокиновой системы организма (цитокины – регуляторы апоптоза), повышается экспрессия шаперонов и смещается иммунооксигенный гомеостаз (табл. 1, 2). Отметим, что активность АМРК и уровень цитохрома С, выраженные как в абсолютных, так и в относительных величинах, при системных заболеваниях соединительной ткани претерпевают наиболее резкие сдвиги по сравнению с другими анализируемыми в рабо-

ТАБЛИЦА 2. АКТИВНОСТЬ СОРБИТОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ (СДГ), СОДЕРЖАНИЕ АДЕНИЛОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ, УРОВЕНЬ АКТИВНЫХ ФОРМ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ И PH В ПЛАЗМЕ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ СЗСТ (M±m)

TABLE 2. ACTIVITY OF SDH, THE CONTENTS ADENILNUCLEOTIDES, THE LEVEL OF ACTIVE FORMS OF OXYGEN RADICALS AND PH IN BLOOD PLASMA IN NORM AND AT SDCT (M±m)

Группа № 1 Group No. 1	СДГ (МЕ) SDH (IU)	АМФ (нМ/мл) AMP (nM/ml)	АДФ (нМ/мл) ADP (nM/ml)	АТФ (нМ/мл) ATP (nM/ml)	АФСР (ед./мг белка) AFRF (unit/mg protein)	pH
Норма (10) Norm	0,8±0,1	54-98 (76)	180-320 (250)	1670-1890 (1780)	12,7±4,3	7,4-7,5
СКВ (10) SLE	26,6±0,8***	180-240 (210)**	90-110 (100)**	830-930 (880)**	54,6±3,6 ***	6,8-7,0*
РА (13) RA	13,8±0,9***	97-129 (113)**	110-158 (134)**	1030-1185 (1107,5)*	26,8±4,0**	7,0-7,3*
ССД (7) SSD	3,12±0,73**	87-110 (98,5)*	210-340 (275)	1530-1625 (1578)	15,8±4,1	7,3-7,4
Группа № 2 Group No. 2						
Норма (12) Norm	2,4±0,3	44-65 (54,5)	155-256 (205,2)	1290-1480 (1385)	20,8±4,2	7,2-7,4
СКВ (9) SLE	10,7±0,4***	27-35 (31)*	72-104 (88)***	530-730 (630)*	41,6±3,7**	6,7-6,9*
РА (10) RA	8,2±0,7***	39-42 (40,5)*	119-137 (128)*	830-985 (907,5)*	31,7±3,6*	6,9-7,0*
ССД (5) SSD	4,1±0,3*	41-54 (47,5)	154-243 (198,5)	1116-1290 (1203)	27,8±5,4*	7,0-7,2

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

те биохимическими показателями (табл. 1). При этом величина отношения АМРК/Сyt с при всех изученных в работе аутоиммунных заболеваниях в среднем вдвое превышает уровень нормы. Это свидетельствует о том, что выраженность дифференциальной генетической экспрессии при различных нозологических формах аутоиммунной патологии имеет в целом сходные механизмы регуляции, которые формируют на основе количественных изменений ферментативной активности новое, специфическое для каждой нозологической формы ревматологического заболевания аутоиммунное качество. Подчеркнем особо, что направленность и динамика иммунновоспалительного процесса при старении и на фоне развития ревматологических заболеваний, несмотря на качественные и количественные различия и особенности, имеют сходную патологическую иммунновоспалительную компоненту, обеспечивающую едиными механизмами аутоиммунную природу ревматологических болезней и геронтологические процессы. Отметим также, что нарастает клеточная деструкция гепатоцитов, о чем свидетельствует резкое возрастание активности СДГ в крови больных (табл. 2) вследствие

нарушения плазматической мембраны гепатоцитов. Можно утверждать, что печень при развитии СКВ и РА включается в общий иммунопатологический процесс, а резко выраженная аутофагия (наряду с апоптозом и некрозом) приводит к массовой гибели гепатоцитов и выходу в кровяное русло продуктов их деградации. При СКВ и РА не только инфекционные агенты и молекулярные паттерны патогенов (pathogen-associated molecular patterns), но и продукты повреждения гепатоцитов (damage-associated molecular patterns) вызывают и усиливают генерализованный иммунный ответ и воспаление, особенно ярко проявляющиеся у пациентов первой группы. В отличие от этого при ССД склеротические изменения в сосудах, в том числе и на уровне микроциркуляции, затрудняют выход СДГ в кровь, что отмечено у пациентов двух обследованных групп.

Заключение

Молекулярные механизмы и специфика развития СКВ, РА и ССД определяются, по-видимому, в том числе и различным соотношением исследованных типов клеточной смерти. Полученные в работе материалы свидетельствуют

о том, что при аутоиммунных заболеваниях соединительной ткани проявляются все типы клеточной смерти, однако степень их выраженности находится в зависимости от нозологической формы заболевания. Ингибирование генетически детерминированного процесса гибели клеток — апоптоза — лежит в основе развития как аутоиммунных заболеваний, так и процессов старения. Поздний апоптоз, перетекающий во вторичный некроз, сопровождается снижением антиоксидантной защиты, развитием аутоиммунной патологии, особенно выраженной при СКВ. Соотношение различных механизмов клеточной смерти (аутофагия, апоптоз, некроз) в крови больных системными заболеваниями соединительной ткани может явиться важным диагностическим и прогностическим показателем при выборе тактики и стратегии медикаментозной терапии. Проведение такой диагностики на молекулярном уровне особенно значимо в случаях с минимальной активностью иммунопатологического процесса, когда клинические проявления системных заболеваний еще не достаточно выражены.

Критически важным как в геронтологии, так и в лечении ревматологических заболеваний является подход с точки зрения эволюционной перспективы изыскания мишеней терапевтического воздействия среди компонентов системы клеточной деструкции [6, 13, 14]. Отмеченная нами возрастная недостаточность функционирования мо-

лекулярных шаперонов класса HSP60 — HSP100 (оцененная косвенно по суммарной АТФ-азной активности, то есть по способности гидролизовать АТФ, снабжая энергией процесс свертывания полипептидной цепи) отражает снижение по мере старения организма способности адекватно реагировать на стрессорные реакции, поддерживать гомеостаз и гомеокинез и формировать правильную, генетически детерминированную пространственную архитектуру белковых молекул. Доказанным является существование шаперон-зависимой аутофагии как механизма поддержания нормальной жизнедеятельности клетки в генно-регуляторных контурах управления и присутствие конформационной патологии в виде агрегированных и денатурированных белков в стареющих клетках при функциональных нарушениях механизмов шаперон-зависимой аутофагии [5, 11]. Шаперон-опосредованная (HSP70 и HSP90) индукция иммунного ответа как сигнальный механизм аутофагии, закрепленный эволюционно только у млекопитающих, возможно, является центральным звеном и «молекулярным переключателем» одной программы гибели клеток на другую [5, 15, 20], запускающим аутоиммунные системные заболевания соединительной ткани и геронтологические процессы [19].

Авторы внесли равный вклад в работу. Конфликт интересов отсутствует. Дополнительное финансирование не привлекалось.

Список литературы / References

1. Голубев А.Г. Биология продолжительности жизни и старения. СПб.: Н-Л, 2015. 384 с. [Golubev A.G. Biology of life expectancy and aging]. St. Petersburg: N-L, 2015. 384 p.
2. Дворяшина И.А., Великородная Ю.И., Почепцов А.Я. Современный взгляд на механизмы и классификацию клеточной гибели // Вестник ВГУ, 2016. Т. 59. С. 137-138. [Dvoryashina I.A., Velikorodnaya Yu.I., Pochepstov A.Ya. Modern view on mechanisms and classification of cellular death. *Vestnik VGU = Voronezh State University Bulletin*, 2016, Vol. 59, pp. 137-138. (In Russ.)]
3. Деев Р.В., Билялов А.И., Жампеисов Т.М. Современные представления о клеточной гибели // Гены и Клетки, 2018. Т. 13, № 1. С. 6-19. [Deyev R.V., Bilyalov A.I., Zhampeisov T.M. Modern ideas of cellular death. *Geny i Kletki = Genes and Cells*, 2018. Vol. 13, no. 1, pp. 6-19. (In Russ.)]
4. Ковалева О.В., Шитова М.С., Зборовская И.Б. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? // Клиническая онкогематология, 2014. Т. 7, № 2. С. 103-113. [Kovalyova O.V., Shitov M.S., Zborovskaya I.B. Autophagy: cellular death or way of survival? *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*, 2014, Vol. 7, no. 2, pp. 103-113. (In Russ.)]
5. Курганов Б.И. Оценка активности молекулярных шаперонов в тест-системах, основанных на подавлении агрегации белков // Успехи биологической химии, 2002. Т. 42. С. 89-138. [Kurganov B.I. Assessment of activity of molecular chaperons in the test systems based on suppression of aggregation of proteins. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry*, 2002, Vol. 42, pp. 89-138. (In Russ.)]
6. Кутукова Н.А., Назаров П.Г., Кудрявцева Г.В., Шишкин В.И. Тучные клетки и старение // Успехи геронтологии, 2016. Т. 29, № 4. С. 586-593. [Kutukova N.A., Nazarov P.G., Kudryavtseva G.V., Shishkin V.I. Mast cells and aging. *Uspekhi gerontologii = Advances in Gerontology*, 2016, Vol. 29, no. 4, pp. 586-593. (In Russ.)]
7. Насонов Е.Л. Ревматология. Национальное руководство по ревматологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 720 с. [Nasonov E.L. Rheumatology. National guide to rheumatology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 720 p.
8. Fatokun A.A., Dawson V.L., Dawson T.M. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br. J. Pharmacol.*, 2014, Vol. 171, no. 8, pp. 2000-2016.
9. Forsythe P. Microbes taming mast cells: Implications for allergic inflammation and beyond *Eur. J. Pharmacol.*, 2016, Vol. 778, pp. 169-175.
10. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J., Vitale I. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD. *Cell Death Differ.*, 2015, Vol. 22, no. 1, pp. 58-73.

11. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ.*, 2018, Vol. 25, pp. 486-541.
12. Gomez-Sintes R., Ledesma M., Boya P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Ageing Res. Rev.*, 2016, Vol. 32, pp. 150-168.
13. Gomez C., Nomellini V., Faunce D., Kovacs E. Innate immunity and aging. *Exp. Gerontol.*, 2008, Vol. 43, no. 8, pp. 718-728.
14. Grazi F., di Caro G., Laghi L. Mast cells and the liver aging process. *Immun. Ageing*, 2013, Vol. 10, no. 1, pp. 9-15.
15. Gutierrez-Arcelus M., Rich S., Raychaudhuri S. Autoimmune diseases-connecting risk alleles with molecular traits of the immune system. *Nat. Rev. Genet.*, 2016, Vol. 17, pp. 160-174.
16. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.*, 2009, Vol. 16, pp. 3-11.
17. Kudriavtseva G.V., Shishkin V.I., Shishkin V.V., Malenkov Y.A. Electrokinetic characteristics of synoviocytes (SC) and the level of antioxidant protection in rheumatoid arthritis (RA). *Ann. Rheum. Dis.*, 2017, Vol. 76, no. 6, pp. 1077-1078.
18. Levine B., Mizushima N., Virgin H. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 2011, Vol. 469, no. 7330, pp. 323-335.
19. Shishkin V.I., Shishkin V.V., Malenkov Y.A., Kudriavtseva G.V. Adenosinmonophosphat-activating protein kinase (AMFK) – the biopower regulator of an autophagy in rheumatoid arthritis (PA). *Ann. Rheum. Dis.*, 2017, Vol. 76, no. 6, pp. 507-508.
20. Zhang J., Guo L., Zhou X. Dihydroartemisinin induces endothelial cell anoikis through the activation of the JNK signaling pathway. *Oncol. Lett.*, 2016, Vol. 12, no. 3, pp. 1896-1900.

Авторы:

Шишкин В.И. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой диагностики функциональных систем факультета прикладной математики – процессов управления ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Назаров П.Г. – д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; профессор, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Маленков Ю.А. – д.э.н., профессор кафедры управления и планирования социально-экономических процессов экономического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Шишкин В.В. – д.э.н., доцент кафедры диагностики функциональных систем факультета прикладной математики – процессов управления ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцева Г.В. – д.б.н., профессор кафедры диагностики функциональных систем факультета прикладной математики – процессов управления ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Картунен А.А. – ассистент кафедры диагностики функциональных систем факультета прикладной математики – процессов управления ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Shishkin V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Diagnostics of Functional Systems, Faculty of Applied Mathematics/Management Processes, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Nazarov P.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Professor, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Malenkov Yu.A., PhD, MD (Economics), Professor, Department of Management and Planning of Social and Economic Processes, Economics Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Shishkin V.V., PhD, MD (Economics), Associate Professor, Department of Diagnostics of Functional Systems, Faculty of Applied Mathematics/Management Processes, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtseva G.V., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Diagnostics of Functional Systems, Faculty of Applied Mathematics/Management Processes, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Kartunen A.A., Assistant Professor, Department of Diagnostics of Functional Systems, Faculty of Applied Mathematics/Management Processes, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ TLR2 И TLR4 У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Ганковская Л.В.¹, Стаховская Л.В.¹, Греченко В.В.¹, Кольцова Е.А.¹,
Уварова О.С.², Демина М.Д.¹, Громова Т.В.¹, Свитиш О.А.¹

¹ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

Резюме. В патогенез ишемического инсульта активно вовлечена система врожденного иммунитета. В условиях церебральной ишемии высвобождается ряд биологически активных веществ, которые взаимодействуют с рецепторами врожденного иммунитета, в частности TLR2 и TLR4, что усугубляет воспаление в тканях головного мозга. Выявление предикторов на уровне системы врожденного иммунитета может позволить прогнозировать клиническое течение ишемического инсульта и обеспечить проведение своевременной терапии. Цель работы – изучение экспрессии рецепторов TLR2 и TLR4 в лейкоцитах периферической крови у больных с ишемическим инсультом в динамике заболевания. В исследование включено 27 человек. Основная группа – пациенты с ишемическим инсультом различной степени тяжести (n = 19). Пациенты основной группы были разделены на две подгруппы: со значением индекса NIHSS менее 10 (n = 10) и более 10 (n = 9). Контрольная группа включала здоровых доноров с отсутствием острых и хронических воспалительных заболеваний в анамнезе (n = 8). В качестве исследуемого материала были использованы лейкоциты периферической крови. Для определения экспрессии генов TLR2 и TLR4 применялся метод ОТ-ПЦР в реальном времени. Определение поверхностной экспрессии TLRs осуществлялось с помощью проточной цитофлуориметрии.

Изучение экспрессии генов TLR2 и TLR4 показало, что на 1-е, 3-и и 7-е сутки после развития инсульта экспрессия гена TLR4 у больных достоверно повышена по сравнению с группой контроля (p < 0,01), в то время как экспрессия гена TLR2 на 3-и сутки болезни статистически не отличается от контрольной группы. Проведенное исследование поверхностной экспрессии рецепторов показало, что средняя интенсивность флуоресценции TLR2 на моноцитах периферической крови больных достоверно повышена на 1-е и 3-и сутки развития заболевания по сравнению с группой контроля. Поверхностная экспрессия TLR4 на моноцитах имеет статистически достоверное повышение лишь на 7-е сутки. Оценка данных поверхностной экспрессии TLRs в подгруппах с разными значениями тяжести по NIHSS показала, что пациенты с индексом NIHSS > 10 имели достоверно более высокий

Адрес для переписки:

Греченко Вячеслав Владимирович
ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 9.
Тел./факс: 8 (916) 828-34-69, (915) 079-87-82,
(926) 702-78-30, (495) 434-90-00, 434-31-65
E-mail: grechenko_v@mail.ru, olga.uvarova.imm@yandex.ru,
lvgan@mail.ru

Address for correspondence:

Grechenko Vyacheslav V.
N. Pirogov Russian National Research Medical University
117997, Russian Federation, Moscow,
Ostrovityanov str., 1, bldg 9.
Phone/fax: 7 (916) 828-34-69, (915) 079-87-82,
(926) 702-78-30, (495) 434-90-00, 434-31-65
E-mail: grechenko_v@mail.ru, olga.uvarova.imm@yandex.ru,
lvgan@mail.ru

Образец цитирования:

Л.В. Ганковская, Л.В. Стаховская, В.В. Греченко,
Е.А. Кольцова, О.С. Уварова, М.Д. Демина,
Громова Т.В., О.А. Свитиш «Гиперэкспрессия TLR2
и TLR4 у больных с ишемическим инсультом в остром
периоде заболевания» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 4. С. 665-674.
doi: 10.15789/1563-0625-HOT-1971

© Ганковская Л.В. и соавт., 2020

For citation:

L.V. Gankovskaya, L.V. Stakhovskaya, V.V. Grechenko,
E.A. Koltsova, O.S. Uvarova, M.D. Demina, T.V. Gromova,
O.A. Svitich "Hyperexpression of TLR2 and TLR4 in patients
with ischemic stroke in acute period of the disease", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 4, pp. 665-674.
doi: 10.15789/1563-0625-HOT-1971

DOI: 10.15789/1563-0625-HOT-1971

уровень поверхностной экспрессии TLR2 в течение всего периода наблюдения, в то время как наибольшая разница в экспрессии TLR4 в подгруппах наблюдалась в 1-е сутки заболевания ($p < 0,05$). У пациентов с ишемическим инсультом выявлено повышение экспрессии TLR2 и TLR4 на уровне генов и молекул по сравнению со здоровыми донорами. Данные показатели могут рассматриваться в качестве возможных предикторов прогноза ишемического инсульта.

Ключевые слова: ишемический инсульт, Toll-подобные рецепторы, TLR2, TLR4, врожденный иммунитет, воспаление

HYPEREXPRESSION OF TLR2 AND TLR4 IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE IN ACUTE PERIOD OF THE DISEASE

Gankovskaya L.V.^a, Stakhovskaya L.V.^a, Grechenko V.V.^a,
Koltsova E.A.^a, Uvarova O.S.^b, Demina M.D.^a, Gromova T.V.^a,
Svitich O.A.^a

^a N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Pathogenesis of ischemic stroke is actively involved in the system of innate immunity. Under conditions of cerebral ischemia, a number of biologically active substances are released that interact with innate immunity receptors, in particular TLR2 and TLR4, which exacerbate inflammation in brain tissue. Identification of predictor markers at the level of the innate immunity system may foresee the clinical course of ischemic stroke and ensure timely treatment. Our objective was to study expression of TLR2 and TLR4 receptors in peripheral blood leukocytes in patients with ischemic stroke in the dynamics of the disease. 27 people were included in the study. The main group consisted of patients with ischemic stroke of varying severity ($n = 19$). Patients of the main group were divided into two subgroups: with an NIHSS index value of < 10 ($n = 10$) and > 10 ($n = 9$). The control group included healthy donors with no history of acute and chronic inflammatory diseases ($n = 8$). Peripheral blood leukocytes were used as the test material. To determine expression of the TLR2 and TLR4 genes, RT-PCR in real time was used. Surface expression of TLRs was determined by flow cytometry. A study of the TLR2 and TLR4 gene expression showed that on the 1st, 3rd and 7th day post-stroke, the TLR4 gene expression in patients was significantly increased, when compared to the control group ($p < 0.01$), whereas TLR2 gene expression on the 3rd day of the disease was not statistically different from the control group. A study of surface expression of receptors showed that the average TLR2 fluorescence intensity on the patients' peripheral blood monocytes was significantly increased on the 1st and 3rd day of disease when compared to the control group. The surface expression of TLR4 on monocytes has a statistically significant increase only on day 7. Assessment of surface expression of TLRs in subgroups with different severity values by NIHSS showed that patients with a NIHSS index > 10 had a significantly higher level of surface of TLR2 expression over the observation period, while the largest difference in TLR4 expression in the subgroups was observed on the 1st day of the disease ($p < 0.05$). Patients with ischemic stroke showed an increase in TLR2 and TLR4 expression at the gene and protein level, compared to healthy donors. These indices can be considered possible predictors for clinical prognosis of ischemic stroke.

Keywords: ischemic stroke, Toll-like receptors, TLR2, TLR4, innate immunity, inflammation

Введение

Ишемический инсульт (ИИ) — острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), возникающее вследствие резкого снижения или прекращения кровотока в сосудах головного мозга, что сопровождается некротическими изменени-

ями в тканях мозга и нарушением его функций. ИИ является одним из ведущих заболеваний, приводящих к инвалидизации и смертности населения по всему миру [4]. Заболеваемость ИИ в России составляет 2,5-3,52 случая на 1000 населения в год, а смертность в остром периоде ОНМК достигает 35%, увеличиваясь на 12-15% к концу

первого года, а в течение 5 лет после инсульта умирают 44% пациентов [4].

Согласно современным научным данным, помимо сосудистых нарушений и других факторов, являющихся непосредственной причиной инсульта, в патогенез ИИ активно вовлечена система врожденного иммунитета, способная индуцировать процесс воспаления в тканях головного мозга [9] на фоне ишемического повреждения [3, 9]. В условиях церебральной ишемии в результате гибели нейронов и других клеток высвобождается ряд биологически активных веществ, ассоциированных с повреждением (DAMPs – damage associated molecular patterns), которые способны взаимодействовать с рецепторами врожденного иммунитета [12, 15, 23]. Среди таких рецепторов наибольший интерес представляет семейство Toll-подобных рецепторов (TLRs), в частности TLR2 и TLR4. В настоящее время собрано уже немало доказательств вовлеченности этих рецепторов в патогенез ИИ. Так, например, имеются данные научной литературы, показывающие, что повышенный уровень экспрессии TLR2 и TLR4 ассоциируется с плохим прогнозом ОНМК и коррелирует с более высокими уровнями провоспалительных цитокинов в сыворотке: TNF α , VCAM-1, IL-1 β и IL-6 [5, 21]. В экспериментальных моделях тромбэмболического инсульта на животных установлено, что внутриклеточная экспрессия провоспалительного цитокина IL-1 β снижается у мышей с дефицитом TLR2 и TLR4 [21]. Кроме того, в этих же работах показано, что выраженная экспрессия TLR4 связана с функциональным исходом и объемом инфаркта головного мозга [5, 24]. При этом активация TLR4 способна усиливать экспрессию факторов, усугубляющих церебральное повреждение, таких как iNOS и IFN γ [10]. Уровень экспрессии TLR4 связывают с инфильтрацией очага некроза нейтрофилами и моноцитами, а также с активностью микроглии: у TLR4-дефицитных мышей заметно снижалось воспаление на границе с зоной ишемии, обусловленное рекрутированием этих клеток [2].

Также показана и функциональная значимость TLR2 в развитии ИИ. Доказано, что микроглиальные клетки в условиях церебральной ишемии способны усиливать повреждение нейронов при повышении экспрессии провоспалительных медиаторов, ассоциированных с TLR2 [15, 22]. На мышинных моделях ИИ установлено, что у животных с нокаутом гена TLR2 объем инфаркта мозга намного меньше, чем у мышей дикого типа [22]. Более того, усиленная экспрессия TLR2 сопряжена с усилением продукции IL-17 и IL-23 микроглией, что приводит к усилению апоптоза нейронов [22].

Таким образом, накопленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что TLR4 и TLR2 играют важную роль в модулировании воспалительного ответа, вызванного церебральной ишемией. Однако роль TLRs в организме больных ишемическим инсультом на системном уровне до сих пор не установлена.

Целью нашего исследования являлось изучение экспрессии генов и белков рецепторов врожденного иммунитета (TLR2 и TLR4) в лейкоцитах периферической крови у больных с ишемическим инсультом в динамике заболевания.

Материалы и методы

В исследование включено 27 человек, среди которых 13 женщин и 14 мужчин. Пациенты были разделены на 2 группы.

1. Основная группа – пациенты, госпитализированные в стационар кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России с ишемическим инсультом различной степени тяжести по шкале NIHSS. В группу вошло 19 человек (n = 19), среди которых 10 женщин (средний возраст 73,6 \pm 13 лет) и 9 мужчин (средний возраст 68,9 \pm 10 лет);

Критерии включения в исследование:

1) первые 24 часа от развития ишемического инсульта;

2) подписание пациентом информированного согласия на участие в исследовании;

3) наличие результатов исследований – нейровизуализации, биохимического анализа крови с определением уровня холестерина, триглицеридов, липопротеидов высокой, низкой и очень низкой плотности, глюкозы, коагулограммы и агрегатограммы, дуплексного сканирования брахиоцефальных артерий.

2. Контрольная группа – здоровые доноры с отсутствием острых и хронических воспалительных заболеваний и инсульта в анамнезе. В группу вошло 8 человек (n = 8), среди которых 2 женщины и 6 мужчин.

В исследование были включены пациенты с ишемическим инсультом после подписания ими или их ближайшими родственниками информированного согласия. Все пациенты, включенные в исследование, госпитализированы в первые 24 часа от дебюта симптоматики, причем 6 из них – в первые 4,5 часа. Первый забор крови для исследования проводился в максимально ранние сроки от момента поступления пациентов в стационар.

При анализе основных модифицируемых факторов риска у пациентов были установлены следующие особенности.

У 17 (94%) больных была выявлена артериальная гипертензия (АД), причем более чем у половины из них заболевание длилось не менее 5 лет, адекватной антигипертензивной терапии пациенты не принимали. На момент поступления у половины больных уровень АД превышал 180/100 мм рт. ст.

Курили больше половины пациентов (55,5%), стаж курения на момент исследования составил в среднем более 10 лет. Алкоголем злоупотребляли 4 (22%) человека.

Сахарный диабет 2 типа выявлен у 2 (11%) больных. У 5 пациентов (28%) была повышенная масса тела, преимущественно за счет абдоминального ожирения. У 12 (67%) больных выявлена дислипидемия, причем на момент возникновения инсульта только один пациент с целью коррекции нарушений обмена липидов принимал статины. Трое пациентов (17%) в анамнезе перенесли инфаркт миокарда.

Ультразвуковое исследование магистральных артерий головы проводили всем пациентам. Атеросклеротические изменения сосудов выявлены у всех пациентов. Стенозирующий атеросклеротический процесс обнаружен у 14 (78%) больных. Стенозы малых градаций (до 50%) выявлены у 9 (50 %) пациентов. Осложненные атеросклеротические бляшки выявлены у 5 (28%) больных.

У 3 (17%) больных выявлены сосудистые аномалии (гипоплазия позвоночной артерии, передняя трифуркация, задняя трифуркация, деформации сонных артерий, гипертоническая макроангиопатия).

Семейный анамнез был исследован у всех пациентов. Выясняли наличие у родственников сердечно-сосудистой патологии (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, артериальная гипертензия) и цереброваскулярных заболеваний (ишемический инсульт).

У 15 (83%) больных выявлена наследственная отягощенность по инсульту. Наследственная отягощенность по инфаркту миокарда была установлена у 41 (39%). У 13 (72%) пациентов выявлена наследственная предрасположенность к артериальной гипертензии. Наследственность по сердечно-сосудистой патологии из всей выборки выявлена у 16 (88%) больных.

С целью изучения экспрессии генов TLR2 и TLR4 в качестве исследуемого материала была использована лейкоцитарная масса, полученная из цельной крови с использованием стерильного 6% раствора декстрана, по методике, описанной ранее (Красный С.А., Фещенко С.П., Богданова Н.В., Торбашевич Е.С. Молекулярные методы оценки генетического риска и мониторинга соматических мутаций для семей, получивших дополнительное ионизирующее облучение, 2004).

Из лейкоцитов крови выделяли общую РНК жидкостнофазным методом, используя набор для выделения РНК «РИБО-сорб» («ИнтерЛабСервис», Россия), согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием «Набора для проведения реакции обратной транскрипции» («Синтол», Россия) с целью синтеза ДНК на матрице РНК интересующего гена (TLR2 и TLR4) для последующего определения числа копий с помощью ПЦР в реальном времени. Реакцию проводили в соответствии с протоколом производителя с применением «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBRGreen I» и праймеров, синтезированных на фирме «Синтол» (Россия). Количество копий ДНК изучаемых генов рассчитывалось по формуле: $(35,476 - Cp) \times 352,6$. Реакцию проводили в амплификаторе ДТ-96.

Определение экспрессии TLRs на поверхности клеток периферической крови осуществлялось с помощью проточной цитофлуориметрии. Исследование проводилось по следующей методике. 100 мкл цельной крови окрашивались моноклональными антителами (МАТ) против TLR2 (или TLR4) (e-Biosciences, США), меченными флуорохромом Alexa Fluor 488, а также МАТ против CD14 (e-Biosciences, США), меченными APC. В качестве изотипического контроля использовали IgG2, меченные соответствующими флуорохромами. Цельная кровь инкубировалась с МАТ в течение 30 мин при температуре 4 °С, затем осуществлялось удаление эритроцитов с помощью лизирующего буфера (IOtest 3 Lysing Solution, Beckman Coulter, США). Окрашенные клетки отмывались в фосфатно-солевом буфере и затем анализировались на проточном цитофлуориметре (Beckman Coulter Navios, Beckman Coulter, США).

Регионы лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов устанавливались по показателям светорассеяния, регион моноцитов дополнительно определялся по маркеру CD14.

Процент связывания TLR2 и TLR4 оценивался с учетом неспецифического связывания, определяемого по изотипическому контролю. Средняя интенсивность флуоресценции клеток (MFI) определялась как отношение средней интенсивности флуоресценции образца к средней интенсивности флуоресценции соответствующего изотипического контроля: $MFI = MFI_{sample} / MFI_{iso}$.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета Statistica 10, программы GraphPad Prism 5 и программы Microsoft Excel 2010. Перед проведением анализа выборки показателей были исследованы на нормальность, симметричность и равенство дисперсий.

По результатам проверки отдано предпочтение непараметрическим методам анализа. Также значения выборок данных были проверены на наличие выбросов (по интерквартильному размаху), в результате чего часть данных была отклонена. Множественное сравнение показателей поверхностной экспрессии TLR2 и TLR4 в динамике с контрольной группой здоровых доноров проводилось с использованием критерия Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis test) с апостериорным сравнением по критерию Данна (Dunn's test).

Однократные сравнения показателей из несвязанных групп проводились с использованием критерия Манна–Уитни. Для оценки взаимосвязи между показателями определялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Работа выполнена на базе кафедры иммунологии МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Результаты

Изучение экспрессии генов TLR2 и TLR4 в лейкоцитах крови у больных ИИ

В результате сравнения экспрессии генов TLR2 и TLR4 у больных ишемическим инсультом с контрольной группой было установлено, что на 1-е, 3-и и 7-е сутки после развития инсульта экспрессия гена TLR4 у больных ИИ достоверно повышена по сравнению с группой здоровых доноров ($p < 0,01$) (рис. 1). При этом на 3-и сутки отмечается незначительное снижение экспрессии гена TLR4 по сравнению с 1-и сутками болезни. Однако на 7-е сутки экспрессия изучаемого гена вновь повышается и оказывается выше, чем в 1-е сутки болезни пациентов.

Динамика экспрессии гена TLR2 у больных с ишемическим инсультом имеет несколько иную тенденцию. Наиболее высокая экспрессия гена наблюдается на 1-е сутки болезни пациентов. При этом на 3-и сутки отмечается снижение экспрессии, которая статистически не отличается от группы контроля, однако на 7-е сутки экспрессия снова достоверно возрастает (рис. 2).

Изучение поверхностной экспрессии TLR2 и TLR4 на лейкоцитах крови у больных с ИИ

Проведенное исследование поверхностной экспрессии рецепторов показало, что показатели средней интенсивности флуоресценции TLR2 на CD14⁺ моноцитах периферической крови больных ишемическим инсультом достоверно повышены на 1 и 3 сутки развития заболевания по сравнению с группой контроля. На 7 сутки развития заболевания показатель экспрессии TLR2 снижается и статистически не отличается от группы здоровых доноров (рис. 3).

Динамика поверхностной экспрессии TLR4 на CD14⁺ моноцитах периферической крови больных ишемическим инсультом имеет несколько

отличающуюся тенденцию. На протяжении всего исследования (1-7 сутки заболевания) значение средней интенсивности флуоресценции TLR4 на моноцитах имеет тенденцию к повышению, при этом на 7 сутки отмечается статистически достоверное повышение показателя, по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$) (рис. 4).

Оценка данных показателей на других популяциях клеток периферической крови не показала достоверных отличий от контрольной группы здоровых доноров.

Корреляционный анализ показателей поверхностной экспрессии TLR2 и TLR4 и клинических показателей тяжести состояния пациентов выявил слабую положительную корреляцию между показателями поверхностной экспрессии TLR2 и значениями шкалы NIHSS ($r = 0,42$; $p < 0,05$). Более детальный анализ показателей позволил разделить пациентов исследуемой группы на две подгруппы: со значением индекса NIHSS менее 10 и более 10.

Оценка данных поверхностной экспрессии TLR2 в этих подгруппах показала, что пациенты с индексом NIHSS > 10 имели более высокий уровень поверхностной экспрессии TLR2 с 1 по 7 сутки наблюдения. При этом на 3 и 7 сутки разница между подгруппами статистически достоверна (рис. 5).

Уровень поверхностной экспрессии TLR4 на моноцитах периферической крови больных этих подгрупп также различался. Однако наибольшая разница в экспрессии TLR4 наблюдалась в 1 сутки заболевания ($p < 0,05$). На 3 и 7 сутки динамики наблюдения в группе с NIHSS > 10 хоть и наблюдалась тенденция к повышению значений, но статистических отличий выявить не удалось (рис. 6).

Обсуждение

В результате проведенного исследования было установлено, что как внутриклеточная, так и поверхностная экспрессии TLR2 и TLR4 у больных с ИИ имеют общую тенденцию к повышению, что может быть связано с высвобождением большого количества эндогенных лигандов этих рецепторов во время церебрального повреждения.

Среди возможных эндогенных лигандов TLRs, вовлеченных в патогенез ИИ, в настоящий момент хорошо изучена роль белков HMGB1, секретируемых в условиях клеточного стресса [9, 14, 20]. Известно, что в культуре глиальных клеток HMGB1 индуцирует экспрессию iNOS, IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF α [6]. Также уровень HMGB1 повышается в крови пациентов с ИИ, при этом, согласно литературным данным, известно, что данный белок может быть предиктором 12-месячного исхода заболевания [6].

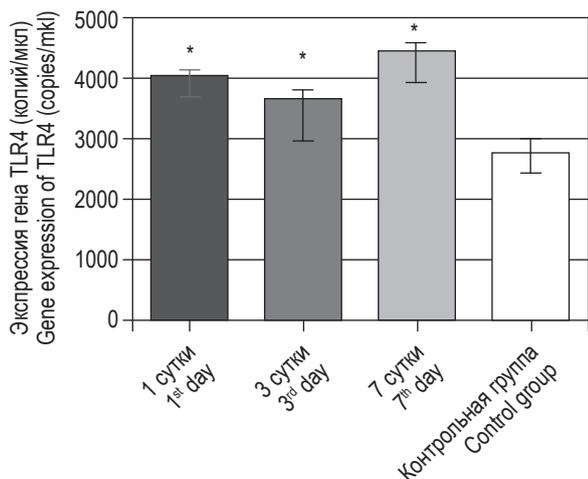


Рисунок 1. Экспрессии гена TLR4 в лейкоцитарной массе больных с ишемическим инсультом на 1-е, 3-и и 7-е сутки после его развития с контрольной группой
Примечание. * – различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$).

Figure 1. Gene expression of TLR4 in the leukocyte mass of patients with ischemic stroke on the 1st, 3rd and 7th day after its development with the control group

Note. *, statistical significance referring to control group ($p < 0.01$).

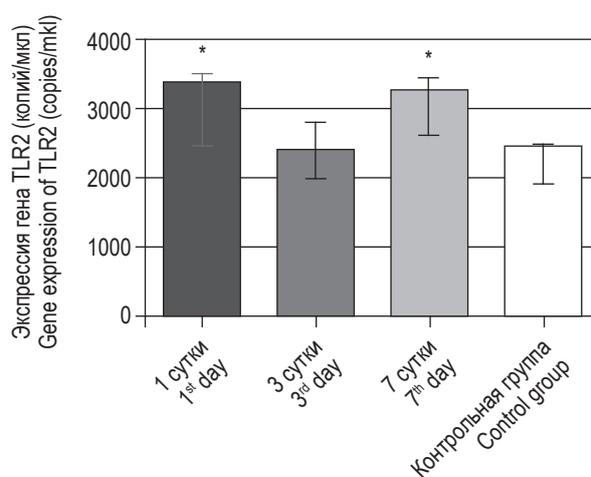


Рисунок 2. Экспрессии гена TLR2 в лейкоцитарной массе больных с ишемическим инсультом на 1-е, 3-и и 7-е сутки после его развития с контрольной группой
Примечание. * – различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$).

Figure 2. Gene expression of TLR2 in the leukocyte mass of patients with ischemic stroke on the 1st, 3rd and 7th day after its development with the control group

Note. *, statistical significance referring to control group ($p < 0.01$).

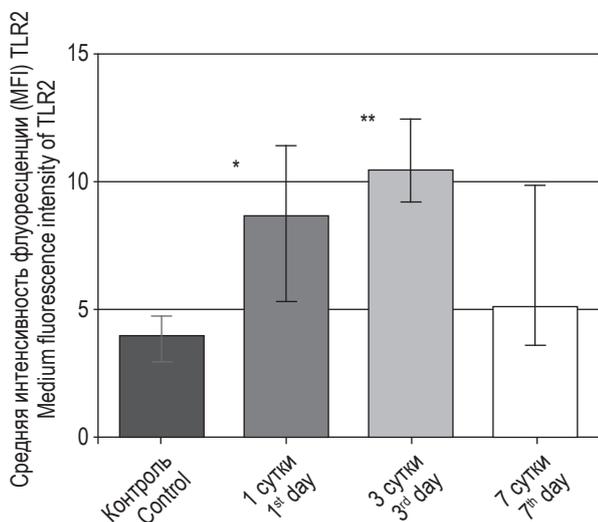


Рисунок 3. Поверхностная экспрессия TLR2 на CD14⁺ моноцитах периферической крови больных с ишемическим инсультом в динамике

Примечание. * – различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$); ** – различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$).

Figure 3. Surface expression TLR2 on CD14⁺ monocytes of peripheral blood of patients with ischemic stroke in dynamic

Note. *, statistical significance referring to control group ($p < 0.05$); **, statistical significance referring to control group ($p < 0.01$).

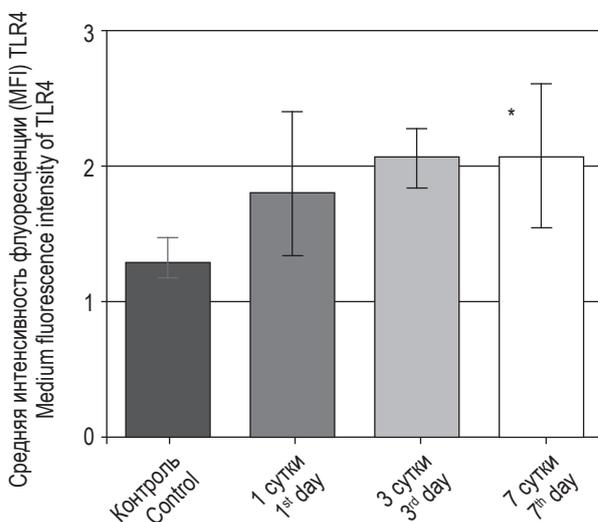


Рисунок 4. Поверхностная экспрессия TLR4 на CD14⁺ моноцитах периферической крови больных с ишемическим инсультом в динамике

Примечание. * – различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Figure 4. Surface expression TLR4 on CD14⁺ monocytes of peripheral blood of patients with ischemic stroke in dynamic

Note. *, statistical significance referring to control group ($p < 0.05$).

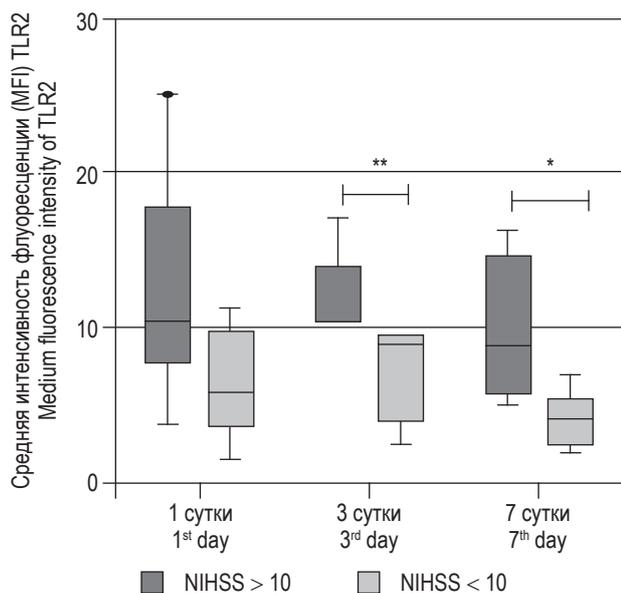


Рисунок 5. Поверхностная экспрессия TLR2 на CD14⁺ моноцитах периферической крови больных с ишемическим инсультом в динамике и с учетом оценки тяжести по шкале NIHSS

Примечание. * – различия между группами достоверны ($p < 0,05$); ** – различия между группами достоверны ($p < 0,01$).

Figure 5. Surface expression TLR2 on CD14⁺ monocytes of peripheral blood of patients with ischemic stroke in dynamic with different NIHSS index

Note. *, statistically significant difference between groups ($p < 0.05$); **, statistically significant difference between groups ($p < 0.01$).

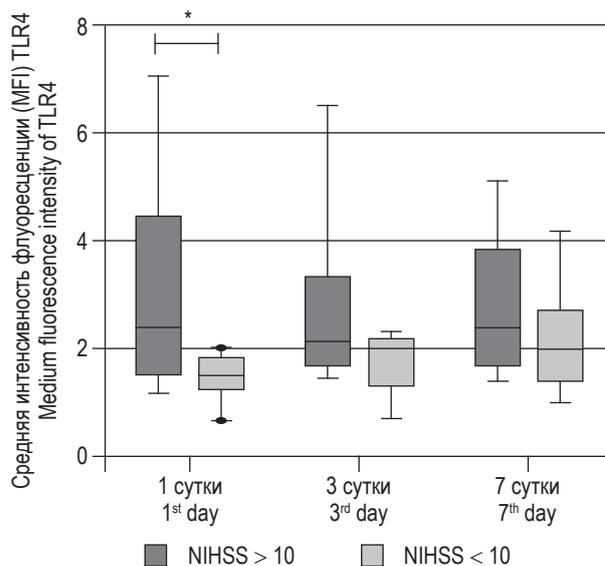


Рисунок 6. Поверхностная экспрессия TLR4 на CD14⁺ моноцитах периферической крови больных с ишемическим инсультом в динамике и с учетом оценки тяжести по шкале NIHSS

Примечание. * – различия между группами достоверны ($p < 0,05$).

Figure 6. Surface expression TLR4 on CD14⁺ monocytes of peripheral blood of patients with ischemic stroke in dynamic with different NIHSS index

Note. *, statistically significant difference between groups ($p < 0.05$).

В качестве активных индукторов TLRs при ИИ представляется также группа белков теплового шока (HSP). Из всех представителей HSP наибольший интерес в патогенезе ИИ представляют HSP60 и HSP70. Так, например, установлено, что связывание HSP60 и HSP70 с TLR2 и TLR4 приводит к повышению синтеза $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ и $IL-6$ в ишемизированном мозге [5, 21].

При оценке экспрессии генов TLR2 и TLR4 было выявлено, что в 1-е сутки болезни экспрессия изучаемых генов достоверно превышает экспрессию генов в контрольной группе. При этом на 3-и сутки экспрессия изучаемых генов имеет тенденцию к снижению. Возможно, это связано с реализацией механизмов ранней защиты мозговой ткани от повреждения. Имеются данные, указывающие, что после создания модели ИИ у мышей и последующей вивисекции в головном мозге через 3 суток после ишемии отмечаются признаки восстановления нервной ткани, хотя одновременно с этим происходит нарастание патологических процессов [10]. Относительно недавно опубликованы результаты исследований, в которых сообщается о нейропротективной роли HSP70 и HSP27 в раннем постишемическом

периоде [3, 11, 15, 16, 18]. Также имеются данные, сообщающие о нейропротективной роли microRNA в остром периоде инсульта [7, 19, 22]. Однако на 7-е сутки вновь отмечается увеличение экспрессии, что, возможно, связано с так называемым феноменом отсроченной гибели нейронов, согласно которому гибель нейронов при ишемическом повреждении происходит по времени неоднородно [2].

Проведение корреляционного анализа между экспрессией генов рецепторов TLR2 и TLR4 и их белками на поверхности моноцитов не выявило прямой взаимосвязи между указанными показателями. Данный факт может быть связан с тем, что мРНК после транскрипции подвергается, с одной стороны, деградации ввиду работы ферментов РНКаз [13], а с другой – действию процесса РНК-интерференции с участием siRNA [14].

В исследовании была выявлена положительная корреляция между степенью тяжести ИИ по шкале NIHSS и экспрессией изучаемых рецепторов. Полученные результаты хорошо подтверждают ранее опубликованные данные Brea D. и соавт. [12], где было показано, что в зависимости от тяжести состояния (определяемой по шкале Рэн-

кин) увеличивается поверхностная экспрессия TLR2 и TLR4 на моноцитах периферической крови больных с ишемическим инсультом. Этот факт может быть связан с большим объемом инфаркта мозга и, соответственно, с большим количеством DAMPs, поступающих в системный кровоток, что в свою очередь приводит к повышению активации системы врожденного иммунитета.

Полученные в результате исследования данные об изменении поверхностной и внутриклеточной экспрессии TLR2 и TLR4 позволяют

оценить изменение активности воспалительного процесса у больных ИИ на системном уровне. Новые данные об изменении экспрессии TLRs при ИИ вносят вклад в понимание патогенеза данного заболевания, что обосновывает необходимость дальнейшего исследования роли врожденного иммунитета в развитии ИИ для разработки и внедрения новых подходов к прогнозированию течения и исхода заболевания, а также таргетной терапии.

Список литературы / References

1. Абатуров А.Е., Волосовец А.П., Юлиш Е.И. Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 2. Лиганды TLR // Здоровье ребенка, 2012. № 6 (41). С. 213-217. [Abaturov A.E., Volosovets A.P., Yulish E.I. The role of Toll-like receptors in recognition of pathogen-associated molecular structures of infectious pathogenic agents and the development of inflammation. Part 2. *Zdorovye rebenka = Child Health*, 2012, no. 6 (41), pp. 213-217. (In Russ.)]
2. Баринов Э.Ф., Евтушенко С.К., Максименко Т.Л., Баринаева М.Э., Твердохлеб Т.А., Евтушенко И.С. Механизмы регуляции воспаления в ишемизированном мозге // Международный неврологический журнал, 2013. № 8 (62). С. 17. [Barinov E.F., Evtushenko S.K., Maksimenko T.L., Barinaeva M.E., Tverdohleb T.A., Evtushenko I.S. Mechanisms of regulation of inflammation in the ischemic brain. *Mezhdunarodnyy neurologicheskiy zhurnal = International Neurological Journal*, 2013, no. 8 (62), p. 17. (In Russ.)]
3. Беленичев И.Ф. Роль белков теплового шока в реализации молекулярно-биохимических механизмов нейропротекции // Фармакология и лекарственная токсикология, 2013. № 6 (36). С. 72-80. [Belenichev I.F. The role of heat shock proteins in the implementation of molecular-biochemical mechanisms of neuroprotection. *Farmakologiya i lekarstvennaya toksikologiya = Pharmacology and Drug Toxicology*, 2013, no. 6 (36), pp. 72-80. (In Russ.)]
4. Ковальчук В.В., Богатырева М.Д., Минуллин Т.И. Современные аспекты реабилитации больных, перенесших инсульт // Неврология и психиатрия, 2014. № 6. С. 101-102. [Kovalchuk V.V., Bogatyreva M.D., Minullin T.I. Current aspects of rehabilitation of stroke patients. *Nevrologiya i psikhatriya = Neurology and Psychiatry*, no. 6, pp. 101-102. (In Russ.)]
5. Константинова Е.В., Кочетов А.Г., Шостак Н.А., Шурдумова М.Х., Еремин И.И., Лянг О.В., Скворцова В.И. Особенности иммунного ответа и воспалительной реакции при атеротромботическом инсульте и инфаркте миокарда // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2015. № 12 (2). С. 48-53. [Konstantinova E.V., Kochetov A.G., Shostak N.A., Shurdumova M.H., Eremin I.I., Lyang O.V., Skvortsova V.I. Characteristics of immune response and inflammatory reaction in atherothrombotic stroke and myocardial infarction. *Zhurnal neurologii i psikhatrii im. S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2015, no. 12 (2), pp. 48-53. (In Russ.)]
6. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Салль Т.С. Алармин 1 (HMGB1) и возрастная патология. Эпигенетические механизмы регуляции // Успехи физиологических наук, 2017. № 4. С. 40-46. [Kuznik B.I., Khavinson V.Kh., Linkova N.S., Sall T.S. Alarmin 1 (HMGB1) and age-related pathology. Epigenetic mechanisms of regulation. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk = Advances in Physiological Sciences*, 2017, no. 4, pp. 40-46. (In Russ.)]
7. Новикова Л.Б., Минибаева Г.М. Роль микроРНК в патогенезе ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2018. № 2. С. 44-46. [Novikova L.B., Minibaeva G.M. A role of microRNA in the pathogenesis of ischemic stroke. *Zhurnal neurologii i psikhatrii im. S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2018, no. 2, pp. 44-46. (In Russ.)]
8. Успенская Ю.А., Комлева Ю.К., Пожиленкова Е.А., Салмин В.В., Лопатина О.Л., Фурсов А.А., Лаврентьев П.В., Белова О.А., Салмина А.Б. Лиганды RAGE-белков: роль в межклеточной коммуникации и патогенезе воспаления // Вестник РАМН, 2015. № 6. С. 696-700. [Uspenskaya Yu.A., Komleva Yu.K., Pozhilenkova E.A., Salmin V.V., Furosov A.A., Lavrentyev P.V., Belova O.A., Salmina A.B. Ligands of RAGE-proteins: role in intercellular communication and the pathogenesis of inflammation. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, no. 6, pp. 696-700. (In Russ.)]
9. Черных Е.Р., Шевела Е.Я., Морозов С.А., Останин А.А. Иммунопатогенетические аспекты ишемического инсульта // Медицинская иммунология, 2018. № 1. С. 19-34. [Chernih E.R., Shevela E.Ya., Morozov S.A., Ostanin A.A. Immunopathogenetic aspects of ischemic stroke. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, no. 1, pp. 19-34. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-19-34.

10. Шертаев М.М., Ибрагимов У.К., Икрамова С.Х., Якубова Ф.Т., Ибрагимов К.У. Морфологические изменения в тканях головного мозга при экспериментальной ишемии // Вестник НГПУ, 2015. № 1 (23). С. 73-77. [Shertaev M.M., Ibragimov U.K., Ikramova S.Kh., Yakubova F.T., Ibragimov K.U. Morphological changes in brain tissue during experimental ischemia. *Vestnik NGPU = Bulletin of the Novosibirsk State Pedagogical University*, 2015, no. 1 (23), pp. 73-77. (In Russ.)]
11. Brea D., Agulla J., Staes A., Gevaert K., Campos F., Sobrino T., Blanco M., Dávalos A., Castillo J., Ramos-Cabrer P. Study of protein expression in peri-infarct tissue after cerebral ischemia. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 12030. doi: 10.1038/srep12030.
12. Brea D., Blanco M., Ramos-Cabrer P., Moldes O., Arias S., Pérez-Mato M., Leira R., Sobrino T., Castillo J. Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2011, Vol. 31, no. 6, pp. 1424-1431.
13. Chanfreau G.F. Impact of RNA modifications and RNA-modifying enzymes on eukaryotic ribonucleases. *Enzymes*, 2017, Vol. 41, pp. 299-329.
14. Fukuda A.M., Badaut J. siRNA treatment: "A Sword-in-the-Stone" for acute brain injuries. *Genes*, Vol. 4, no. 3, pp. 435-450.
15. Gülke E., Gelderblom M., Magnus T. Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, 2018, Vol. 11, 1756286418774254. doi: 10.1177/1756286418774254.
16. Kim J.Y., Han Y., Lee J.E., Yenari M.A. The 70-kDa heat shock protein (Hsp70) as a therapeutic target for stroke. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2018, Vol. 22, no. 3, pp. 191-199.
17. Lackie R.E., Maciejewski A., Ostapchenko V.G., Marques-Lopes J., Choy W.Y., Duennwald M.L., Prado V.F., Prado M.A.M. The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.*, 2017, Vol. 11, 254. doi: 10.3389/fnins.2017.00254.
18. Liu W., Chen X., Zhang Y. Effects of microRNA-21 and microRNA-24 inhibitors on neuronal apoptosis in ischemic stroke. *Am. J. Transl. Res.*, 2016, Vol. 8, no. 7, pp. 3179-3187.
19. Ma L., Sun P., Zhang J.C., Zhang Q., Yao S.L. Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. *Int. J. Mol. Med.*, 2017, Vol. 40, no. 1, pp. 31-38.
20. Sharp F.R., Zhan X., Liu D.Z. Heat shock proteins in the brain: role of Hsp70, Hsp 27 and HO-1 (Hsp32) and their therapeutic potential. *Transl. Stroke Res.*, 2013, Vol. 4, no. 6, pp. 685-692.
21. Shichita T., Ito M., Yoshimura A. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection. *Front. Cell. Neurosci.*, 2014, Vol. 8, 319. doi: 10.3389/fncel.2014.00319.
22. Wang Y., Ge P., Zhu Y. TLR2 and TLR4 in the brain injury caused by cerebral ischemia and reperfusion. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, 124614. doi: 10.1155/2013/124614.
23. Zhou J., Zhang J. Indefication of miRNA-21 and miRNA-24 in plasma as potential early stage markers of acute cerebral infarction. *Mol. Med. Rep.*, 2014, Vol. 10, no. 2, pp. 971-976.
24. Ziegler G., Prinz V., Albrecht M.W., Harhausen D., Khojasteh U., Nacken W., Endres M., Dirnagl U., Niefeld W., Trendelenburg G. Mrp-8 and -14 mediate CNS injury in focal cerebral ischemia. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, Vol. 1792, no. 12, pp. 1198-1204.

Авторы:

Ганковская Л.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Стаховская Л.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Gankovskaya L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, Faculty of Biomedicine, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Stakhovskaya L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Греченко В.В. — к.м.н., доцент, доцент кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кольцова Е.А. — к.м.н., профессор кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Уварова О.С. — студент 6 курса Института клинической медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Демина М.Д. — студент 6 курса, ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Громова Т.В. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, профессор кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Grechenko V.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Biomedicine, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Koltsova E.A., PhD (Medicine), Professor, Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Uvarova O.S., 6th year Student, Institute of Clinical Medicine, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Demina M.D., 6th year Student, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Gromova T.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Biomedicine, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Department of Immunology, Faculty of Biomedicine, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 18.03.2020
Принята к печати 06.05.2020

Received 18.03.2020
Accepted 06.05.2020

БАЛАНС CD4⁺IFN γ ⁺ И CD4⁺CD25^{hi}T-КЛЕТОК КАК РАННИЙ ПРЕДИКТОР 3-МЕСЯЧНОГО ИСХОДА У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ

**Морозов С.А.¹, Тихонова М.А.¹, Пронкина Н.В.¹, Штоббе А.А.²,
Леплина О.Ю.¹, Шевела Е.Я.¹, Останин А.А.¹, Черных Е.Р.¹**

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

² МБУЗ «Городская клиническая больница № 1», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Раннее прогнозирование исходов ишемического инсульта (ИИ) является важной задачей, поскольку может помочь в оптимизации лечебной программы и персонализации лечения. Учитывая, что при инсульте Т-лимфоциты с регуляторной активностью участвуют в различных патофизиологических процессах, включая воспаление, иммунодепрессию, поражение и репарацию мозговой ткани, исследование Т-клеток в качестве потенциальных биомаркеров представляет особое значение. Целью работы явилось исследование субпопуляций циркулирующих Т-клеток с фенотипом Т-хелперов 1 типа (Th1), регуляторных Т-клеток (Treg) и их соотношения у пациентов в остром периоде ИИ в зависимости от тяжести, выраженности воспалительного ответа и 3-месячного исхода (по модифицированной шкале Рэнкина, mRs). В исследование был включен 61 пациент с впервые выявленным ИИ (тяжесть по шкале NIHSS ≥ 5 баллов) в остром периоде (24-48 ч после инсульта) и 20 сопоставимых по полу и возрасту доноров. Лабораторное обследование включало оценку лейкоцитоза, нейтрофильно-лимфоцитарного индекса (НЛИ) и СРБ. Исследование Т-клеток проводили в популяции мононуклеарных клеток периферической крови. Th1 и Treg оценивали, соответственно, по содержанию CD4⁺IFN γ ⁺ и CD4⁺CD25^{hi}T-клеток методом проточной цитофлуориметрии. В первые 24-48 ч с момента нарушения мозгового кровообращения пациенты характеризовались повышенными показателями лейкоцитоза, НЛИ и СРБ. Тяжесть инсульта ассоциировалась с большей выраженностью системной воспалительной реакции, что подтверждалось достоверно более высокими показателями лейкоцитоза, НЛИ и СРБ при тяжелом инсульте, чем при инсульте легкой степени тяжести, а также наличием прямой взаимосвязи NIHSS с уровнем НЛИ и СРБ. Также у пациентов отмечалось достоверное снижение CD4⁺IFN γ ⁺Th1-клеток, возрастание CD4⁺CD25^{hi}Treg и выраженное снижение индекса Th1/Treg. При этом в группе с NIHSS ≥ 8 (среднетяжелый и тяжелый инсульт) доля CD4⁺IFN γ ⁺T-клеток находилась в прямой, а содержание CD4⁺CD25^{hi}T-клеток – в обратной корреляционной зависимости с уровнем СРБ и НЛИ. Изменения Т-клеточных субпопуляций были более выражены у пациентов с благоприятным 3-месячным исходом (mRs > 3). В результате пациенты с неблагоприятным исходом (mRs ≤ 3) отличались от оппозитной группы более высоким содержанием CD4⁺IFN γ ⁺, меньшим уровнем CD4⁺CD25^{hi}T-клеток и более (4-кратно) высоким индексом соот-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

С.А. Морозов, М.А. Тихонова, Н.В. Пронкина,
А.А. Штоббе, О.Ю. Леплина, Е.Я. Шевела,
А.А. Останин, Е.Р. Черных «Баланс CD4⁺IFN γ ⁺
и CD4⁺CD25^{hi}T-клеток как ранний предиктор
3-месячного исхода у больных ишемическим инсультом»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4.
С. 675-684.
doi: 10.15789/1563-0625-BOC-1993

© Морозов С.А. и соавт., 2020

For citation:

S.A. Morozov, M.A. Tikhonova, N.V. Pronkina, A.A. Shtobbe,
O. Yu. Leplina, E. Ya. Shevela, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh
“Balance of CD4⁺IFN γ ⁺ and CD4⁺CD25^{hi}T cells as early
predictor of a 3-month outcome in ischemic stroke patients”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 4, pp. 675-684.
doi: 10.15789/1563-0625-BOC-1993

DOI: 10.15789/1563-0625-BOC-1993

ношения $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$. ROC-анализ выявил «хорошее» качество прогноза, основанного на оценке индекса $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ в качестве монопредиктора неблагоприятного исхода (AUC = 0,75) и «очень хорошее» качество прогноза при комбинации указанного индекса с баллом по шкале NIHSS (AUC = 0,82). Полученные данные позволяют предположить, что уменьшение Th1/Treg индекса за счет снижения $CD4^+IFN\gamma^+$ и повышения $CD4^+CD25^{hi}$ Т-клеток в остром периоде ИИ является компенсаторной реакцией, направленной на сдерживание воспалительного ответа, и характеризуется прогностической значимостью при использовании в качестве раннего предиктора 3-месячного исхода.

Ключевые слова: $CD4^+IFN\gamma^+$, $CD4^+CD25^{hi}$, ишемический инсульт, исходы

BALANCE OF $CD4^+IFN\gamma^+$ AND $CD4^+CD25^{hi}$ T CELLS AS EARLY PREDICTOR OF A 3-MONTH OUTCOME IN ISCHEMIC STROKE PATIENTS

Morozov S.A.^a, Tikhonova M.A.^a, Pronkina N.V.^a, Shtobbe A.A.^b,
Leplina O.Yu.^a, Shevela E.Ya.^a, Ostanin A.A.^a, Chernykch E.R.^a

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

^b City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Early prediction for ischemic stroke (IS) outcome is a major challenge since it may help to optimize treatment program and to make it more personalized. Since T cells with regulatory activity are involved in different pathophysiological processes in brain stroke, including inflammation, immune suppression, brain damage and repair, the study of T cells as potential biomarkers has essential importance. The present work aimed to study the circulating T cell subsets with phenotype of type 1 T helper cells (Th1) and regulatory T cells (Treg), and their ratio during the acute phase of IS, depending on stroke severity, inflammatory response and 3-month outcome (according to modified Rankin scale, mRs). Patients and methods. The study included 61 patients with a newly diagnosed IS (severity according to NIHSS ≥ 5), in the first 24–48 h after stroke onset, and 20 age/sex-related healthy donors. Laboratory examination included assessment of leukocytosis, neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and CRP concentration. Mononuclear cells were isolated from peripheral blood to study T cell subsets. Th1 and Tregs were measured by FACS analysis as $CD4^+IFN\gamma^+$ and $CD4^+CD25^{hi}$ T cells, respectively. During the first 24–48 h after stroke, the patients had elevated values of leukocyte counts, NLR and CRP. Higher levels of these parameters in severe stroke compared with mild stroke, as well as direct correlation of NIHSS with NLR and CRP evidenced that the stroke severity was associated with more pronounced inflammatory response. Patients were also characterized by a significant decrease in $CD4^+IFN\gamma^+$ Th1 cells, an increase in $CD4^+CD25^{hi}$ Treg, and a marked decrease in Th1/Treg ratio. Furthermore, in patients with NIHSS ≥ 8 (moderate and severe stroke), the percentage of $CD4^+IFN\gamma^+$ T cells was in direct correlation, and the number of $CD4^+CD25^{hi}$ T cells was inversely related to CRP and NLR values. The changes of T cell subsets were more pronounced in patients with a favorable 3-month outcome (mRs > 3). As a result, the patients with poor outcome (mRs ≤ 3) had higher $CD4^+IFN\gamma^+$ T cell proportion, lower $CD4^+CD25^{hi}$ T cell percentage and 4-fold higher $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ ratio compared with opposing group. ROC analysis revealed a “good” quality of prognosis based on evaluation of the $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ ratio as a monopredictor of adverse outcome (AUC = 0.75) and “very good” quality of prognosis when the indicated ratio was combined with NIHSS scale (AUC = 0.82). The data obtained suggest that a decrease of Th1/Treg ratio, due to a decrease in $CD4^+IFN\gamma^+$ and increased $CD4^+CD25^{hi}$ T cell counts during the acute phase of ischemic stroke is a compensatory reaction directed at inhibition of inflammatory response, and has a prognostic significance as early predictor of the outcome at 3 months.

Keywords: $CD4^+IFN\gamma^+$, $CD4^+CD25^{hi}$, ischemic stroke, outcomes

Введение

Ишемический инсульт (ИИ) остается одной из приоритетных медико-социальных проблем в силу высоких показателей распространенности, летальности, инвалидизации и трудовых потерь среди работоспособного населения [3]. Оценка риска неблагоприятного исхода в раннем периоде инсульта необходима для оптимизации программы лечения и разработки персонализированных методов терапии. Однако прогнозирование исхода инсульта остается сложной задачей. Традиционно к клинически значимым предикторам относят тяжесть инсульта, возраст пациентов и развитие ранних инфекционных осложнений в постинсультном периоде. Недавними исследованиями показано также, что биомаркерами исходов могут являться параметры крови, отражающие системное воспаление (СРБ, лейкоцитоз) и иммунный ответ (IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, MCP-1, TNF α) [8].

Патогенез ИИ связан с иммунным ответом на ишемическое поражение мозговой ткани, лежащим в основе локальной и системной воспалительной реакции [12]. Соответственно, иммунные параметры, и в частности Т-клетки, участвующие в регуляции иммунного ответа и воспаления, могут иметь патогенетическую и прогностическую значимость [2]. Среди различных субпопуляций CD4⁺Т-клеток Т-хелперы 1 типа (Th1) активируют провоспалительный фенотип макрофагов и микроглии [5, 11], тогда как регуляторные Т-клетки (Treg) подавляют провоспалительную активность клеток врожденного иммунитета [10]. Поэтому баланс этих Т-клеточных субпопуляций может во многом определять характер течения и исход церебрального инсульта.

Согласно данным литературы, возрастание Treg в мозговой ткани и периферической крови наблюдается уже с первых дней после ишемического поражения мозговой ткани [9, 18]. Однако роль Treg остается неоднозначной. Обладая способностью ингибировать воспалительную реакцию, выработку металлопротеиназ, активность эффекторных Т-клеток и активацию микроглии, Treg могут оказывать нейропротективный эффект [9]. Позитивный эффект Treg может быть также обусловлен стимулирующим влиянием на нейрогенез [13] и постишемическую неоваскуляризацию [19]. С другой стороны, Treg могут вызывать повреждение микрососудов и потенцировать ишемическое поражение головного мозга [7], а также участвовать в индукции иммуносупрессии, являющейся ведущей причиной инфекционных осложнений и летальности при ИИ [15].

Данные об изменении содержания циркулирующих Th1 в остром периоде ИИ у человека отсутствуют. Тем не менее в модели инсульта на

животных показано, что снижение уровня IFN γ , продуцируемого Th1, с помощью системного введения IFN γ -нейтрализующих антител уменьшает размеры зоны инфаркта и выраженность неврологического дефицита [14].

Целью настоящей работы явилось исследование субпопуляций циркулирующих Т-клеток с фенотипом Th1, Treg и их баланса в остром периоде ИИ в зависимости от тяжести инсульта, выраженности воспалительного ответа и 3-месячного исхода заболевания.

Материалы и методы

Рекрутирование пациентов (мужчины и женщины ≥ 18 лет) проводили из числа больных, находившихся на лечении в неврологическом отделении ГБУЗ НСО «ГКБ № 1» (г. Новосибирск) с диагнозом «острое нарушение мозгового кровообращения». Критериями включения являлись: наличие впервые возникшего ИИ в бассейне средней мозговой артерии, верифицированного в соответствии с критериями МКБ-10 методами нейровизуализации (КТ/МРТ); острый период (первые 24-48 ч после инсульта); атеротромботический или кардиоэмболический подтип ИИ, определенный на основании критериев TOAST; тяжесть неврологического дефицита ≥ 5 баллов по шкале NIHSS; наличие полной функциональной независимости до развития инсульта (0-1 балл по шкале Рэнкина); подписанное пациентом (или его представителем) добровольное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения являлись: отказ пациента (или его представителя) от участия в исследовании; наличие острого воспалительного, инфекционного, нейродегенеративного, аутоиммунного заболевания; наличие выраженной почечной или печеночной недостаточности, сахарного диабета в тяжелой форме; наличие повторного ОНМК; наличие в анамнезе острого инфаркта миокарда, опухолевого процесса, черепно-мозговой травмы, операции на сердце и сосудах шеи; прием иммуносупрессорных препаратов в течение 12 мес. до забора крови. Контрольную группу составили 20 сопоставимых по полу и возрасту здоровых доноров.

Тяжесть инсульта определяли в баллах по шкале инсульта национального института здоровья США (NIHSS). Функциональный исход оценивали через 3 мес. по модифицированной 6-балльной шкале степени инвалидизации Рэнкина (mRs). Пациенты с уровнем mRs ≤ 3 (что соответствует умеренной инвалидизации) были отнесены в группу с благоприятным исходом, а с уровнем mRs > 3 (включающих грубую инвалидизацию, вегетативный статус или летальный исход) – в группу с неблагоприятным исходом.

Лабораторное обследование пациентов проводили в первые 24–48 ч. Выраженность системной воспалительной реакции оценивали по концентрации С-реактивного белка (СРБ) и показателям крови (лейкоцитоз, нейтрофильно-лимфоцитарный индекс (НЛИ)). Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли стандартно центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколаверографина. Т-клетки с фенотипом Th1 и Treg оценивали, соответственно, по числу CD4⁺IFN γ ⁺ и CD4⁺CD25^{hi}T-лимфоцитов методом проточной цитофлюориметрии с использованием FITC-меченных анти-CD25, PerCP-меченных анти-CD4 и PE-меченных анти-IFN γ моноклональных антител (BD PharMingen, США). Фиксацию и пермеабиллизацию клеток для оценки внутриклеточной экспрессии IFN γ проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов (CD4), используя коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабиллизации “Transcription Factor Buffer Set” в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences). Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флюоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (PerCP), (BD FACSCalibur, CellQuest Software, США). Относительное содержание CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺IFN γ ⁺T-клеток представлено в виде процента от количества лимфоцитов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Statistica 6.0 и Graph Pad Prism 5.0. Для выявления значимых разли-

чий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Корреляционную связь оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (r_s). Прогностическую значимость оценивали с использованием ROC-анализа.

Результаты

В исследуемую группу ($n = 61$) были включены 32 мужчины и 29 женщин в возрасте от 40 до 80 лет с тяжестью инсульта ≥ 5 баллов по шкале NIHSS (табл. 1). Доля пациентов с ИИ средней и тяжелой степени тяжести среди них составила более 70%. Пациенты в группах с различной степенью тяжести не различались по полу и возрасту. Неблагоприятный 3-месячный исход был отмечен у 22 (36,1%) пациентов, причем в подавляющем большинстве случаев (21/22; 95%) регистрировался в группах больных со средней и тяжелой степенью тяжести ИИ (NIHSS ≥ 8).

В первые 24–48 ч после ИИ больные характеризовались достоверным возрастанием абсолютного количества лейкоцитов, НЛИ и СРБ, отражающих системное воспаление (табл. 2). Значимое увеличение этих показателей регистрировалось у больных с легкой степенью тяжести и нарастало по мере утяжеления ИИ. Так, показатели лейкоцитоза, НЛИ и СРБ при тяжелом инсульте были достоверно выше, чем при инсульте легкой степени тяжести. Более того, балл по шкале NIHSS находился в умеренной, но достоверной прямой корреляционной связи с уровнем лейкоцитоза ($r_s = 0,36$; $p = 0,005$), СРБ ($r_s = 0,36$; $p = 0,005$)

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ

TABLE 1. BASELINE CHARACTERISTICS OF PATIENTS

Параметры Parameters	Общая группа Total group	Степень тяжести инсульта Stroke severity		
		Легкая Mild (NIHSS ≤ 7)	Средняя Moderate (NIHSS 8-12)	Тяжелая Severe (NIHSS > 12)
Количество (n) Number (n)	61	16 (26,2%)	15 (24,6%)	30 (49,2%)
Возраст, лет Age, years Me (min-max)	68 (40-80)	66 (40-80)	65 (54-77)	70 (53-80)
Пол (муж/жен) Sex (male/female)	32/29	10/6	5/10	17/13
NIHSS Me (min-max)	12 (5-26)	6 (5-7)	11 (8-12)	17 (13-26)
Неблагоприятный 3-мес. исход (n) Adverse 3-month outcome (n)	22 (36,1%)	1 (6,3%)	5 (33,3%)	16 (53,3%)

и НЛИ ($r_s = 0,37$; $p = 0,003$). Таким образом, тяжесть ИИ была сопряжена с выраженностью воспалительной реакции.

Оценка в периферической крови субпопуляций Т-клеток выявила достоверное 2-кратное возрастание у больных относительного содержания CD4⁺Т-клеток с высокой экспрессией CD25 и выраженное снижение CD4⁺Т-клеток с внутриклеточным содержанием IFN γ . Соответственно, индекс соотношения CD4⁺IFN γ ⁺/CD4⁺CD25^{hi} у пациентов был практически в 8 раз ниже, чем у здоровых доноров. Анализ взаимосвязи между CD4⁺IFN γ ⁺ и CD4⁺CD25^{hi}Т-клетками, а также этих субпопуляций с выраженностью воспалительной реакции в целом по группе не выявил

значимых корреляционных зависимостей. В то же время у пациентов со среднетяжелым и тяжелым инсультом (NIHSS ≥ 8) относительное количество CD4⁺IFN γ ⁺Т-клеток находилось в обратной взаимосвязи с долей CD4⁺CD25^{hi}Т-клеток ($r_s = -0,47$; $p = 0,007$; $n = 31$). Кроме того, в этой подгруппе больных обнаруживались значимые корреляционные взаимосвязи между уровнем и соотношением CD4⁺IFN γ ⁺ и CD4⁺CD25^{hi}Т-клеток с маркерами системной воспалительной реакции (табл. 3). Так, между количеством CD4⁺CD25^{hi}Treg и показателями воспаления (СРБ и НЛИ) выявлялась обратная зависимость, тогда как доля CD4⁺IFN γ ⁺Th1 и CD4⁺IFN γ ⁺/CD4⁺CD25^{hi} индекс прямо коррелировали с кон-

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ И УРОВЕНЬ CD4⁺IFN γ ⁺ И CD4⁺CD25^{hi}Т-КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНОЙ ТЯЖЕСТЬЮ ИНСУЛЬТА

TABLE 2. INFLAMMATORY INDICATORS AND LEVEL OF CD4⁺IFN γ ⁺ AND CD4⁺CD25^{hi}T CELLS IN PATIENTS WITH VARIOUS STROKE SEVERITY

Параметры Parameters	Доноры Donors (n = 20)	Пациенты Patients (n = 61)	Степень тяжести инсульта Stroke severity		
			Легкая Mild (NIHSS ≤ 7)	Средняя Moderate (NIHSS 8-12)	Тяжелая Severe (NIHSS > 12)
Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$) Leukocytes ($\times 10^9/\text{л}$)	6,1 (5,2-6,7)	9,4* (8,1-11,9)	8,5* (5,8-10,1)	9,0* (7,2-11,2)	9,8*# (8,6-13,8)
НЛИ NLR	1,87 (1,4-2,9)	5,0* (3,0-7,9)	3,7* (2,3-5,8)	4,6* (2,5-9,7)	8,5*# (4,2-10,1)
СРБ (мг/л) CRP (mg/l)	2,1 (1,7-4,7)	30,3* (16,7-69,0)	17,6* (11,0-30,9)	20,4* (11,1-59,1)	41,7*# (21,1-103,8)
CD4 ⁺ IFN γ ⁺ (%)	15,1 (4,3-29,0)	3,1* (1,0-5,8)	2,9* (1,5-5,4)	3,1* (0,9-6,8)	3,1* (0,9-5,8)
CD4 ⁺ CD25 ^{hi} (%)	1,0 (1,0-1,2)	2,0* (1,1-3,0)	1,8* (1,6-3,0)	2,0* (1,3-3,0)	2,0* (1,0-3,0)
Индекс CD4 ⁺ IFN γ ⁺ / CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD4 ⁺ IFN γ ⁺ / CD4 ⁺ CD25 ^{hi} ratio	11,8 (4,3-24,2)	1,5* (0,57-3,70)	1,4* (0,85-3,20)	1,2* (0,7-2,3)	1,6* (0,5-6,5)

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); * $p_U < 0,05$ – достоверность различий с донорами; # $p_U < 0,05$ – достоверность различий с больными легкой степени тяжести (U-критерий Манна–Уитни); НЛИ – нейтрофильно-лимфоцитарный индекс.

Note. Data are presented as median and interquartile range (in brackets); * $p_U < 0.05$, the significance of differences compared with donors; # $p_U < 0.05$, the significance of differences compared with mild stroke severity patients (Mann–Whitney U test); NLR – neutrophil-lymphocytes ratio.

центрацией СРБ и уровнем НЛИ. При этом тяжесть инсульта по шкале NIHSS не коррелировала ни с содержанием CD4⁺IFN γ ⁺Т-клеток ($r = 0,13$; $p = 0,5$; $n = 31$), ни с соотношением CD4⁺IFN γ ⁺ и CD4⁺CD25^{hi}Т-клеток ($r = 0,13$; $p = 0,49$; $n = 31$). Таким образом, содержание CD4⁺IFN γ ⁺Т-клеток и их соотношение с CD4⁺CD25^{hi}Treg было ассо-

циировано именно с выраженностью воспалительного ответа.

Чтобы проанализировать возможную взаимосвязь циркулирующих CD4⁺IFN γ ⁺ и CD4⁺CD25^{hi}Т-клеток и их соотношения с исходом инсульта, было проведено сравнительное исследование этих показателей в подгруппах больных с благоприятным ($mRs \leq 3$) и неблаго-

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ УРОВНЕМ И СООТНОШЕНИЕМ CD4⁺IFN γ ⁺ И CD4⁺CD25^{hi}Т-КЛЕТОК С МАРКЕРАМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ СО СРЕДНЕТЯЖЕЛЫМ И ТЯЖЕЛЫМ ИНСУЛЬТОМ (n = 31)

TABLE 3. CORRELATION BETWEEN THE LEVEL AND RATIO OF CD4⁺IFN γ ⁺ AND CD4⁺CD25^{hi}T CELLS WITH INFLAMMATORY RESPONSE MARKERS IN PATIENTS WITH MODERATE AND SEVERE STROKE (n = 31)

Параметры Parameters	НЛИ NLR	СРБ (мг/л) CRP (mg/l)
CD4 ⁺ CD25 ^{hi} Treg ($\times 10^6$ /л) CD4 ⁺ CD25 ^{hi} Treg ($\times 10^6$ /l)	$r = -0,44$; $p = 0,0008$	$r = -0,36$; $p = 0,02$
CD4 ⁺ IFN γ ⁺ Th1 (%)	$r = 0,36$; $p = 0,047$	$r = 0,55$; $p = 0,0014$
Индекс CD4 ⁺ IFN γ ⁺ /CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD4 ⁺ IFN γ ⁺ /CD4 ⁺ CD25 ^{hi} ratio	$r = 0,33$; $p = 0,07$	$r = 0,53$; $p = 0,002$

Примечание. r – коэффициент корреляции Спирмена.

Note. r , Spearman rank order correlations.

ТАБЛИЦА 4. ЗНАЧИМОСТЬ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ПАРАМЕТРОВ В РАННЕМ ПРОГНОЗЕ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО 3-МЕСЯЧНОГО ИСХОДА ИНСУЛЬТА (ROC-АНАЛИЗ)

TABLE 4. SIGNIFICANCE OF THE ANALYZED PARAMETERS IN THE EARLY PROGNOSIS OF ADVERSE 3-MONTH STROKE OUTCOME (ROC-ANALYSIS)

Параметр Parameter	AUC	p	SN (%)	SP (%)
NIHSS > 14,5	0,72	0,01	62	57
СРБ > 41,7 мг/л CRP > 41.7 mg/l	0,72	0,08	67	74
НЛИ > 5,3 NLR > 5.3	0,70	0,025	71	65
Индекс CD4 ⁺ IFN γ ⁺ /CD4 ⁺ CD25 ^{hi} > 1,19 CD4 ⁺ IFN γ ⁺ /CD4 ⁺ CD25 ^{hi} ratio > 1.19	0,75	0,02	73	67
Индекс CD4 ⁺ IFN γ ⁺ /CD4 ⁺ CD25 ^{hi} + NIHSS CD4 ⁺ IFN γ ⁺ /CD4 ⁺ CD25 ^{hi} ratio + NIHSS	0,82	0,03	79	75

Примечание. AUC – площадь под кривой; p – значимость теста; SN – чувствительность; SP – специфичность.

Note. AUC, area under the curve; p, significance of the test; SN, sensitivity; SP, specificity.

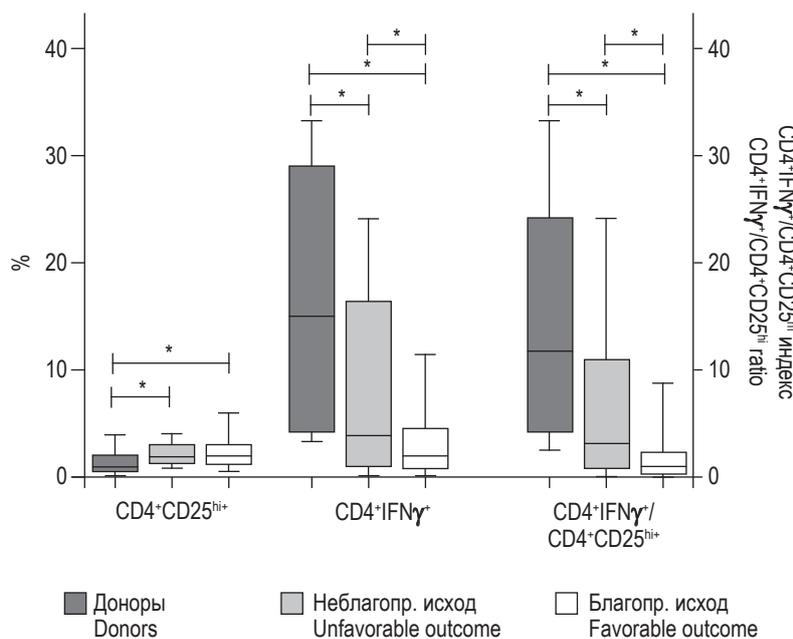


Рисунок 1. Относительное содержание и соотношение $CD4^+IFN\gamma^+$ и $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток в группах пациентов, оппозитных по 3-месячному исходу инсульта

Примечание. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного диапазона и диапазона минимальных-максимальных значений. * – $p_U < 0,05$ (U-критерий Манна–Уитни).

Figure 1. Percentage and ratio of $CD4^+IFN\gamma^+$ and $CD4^+CD25^{hi}T$ cells in patients opposed to a 3-month stroke outcome

Note. The data are presented as the median, interquartile range, and the range of minimum-maximum values. *, $p_U < 0.05$ (Mann–Whitney U test).

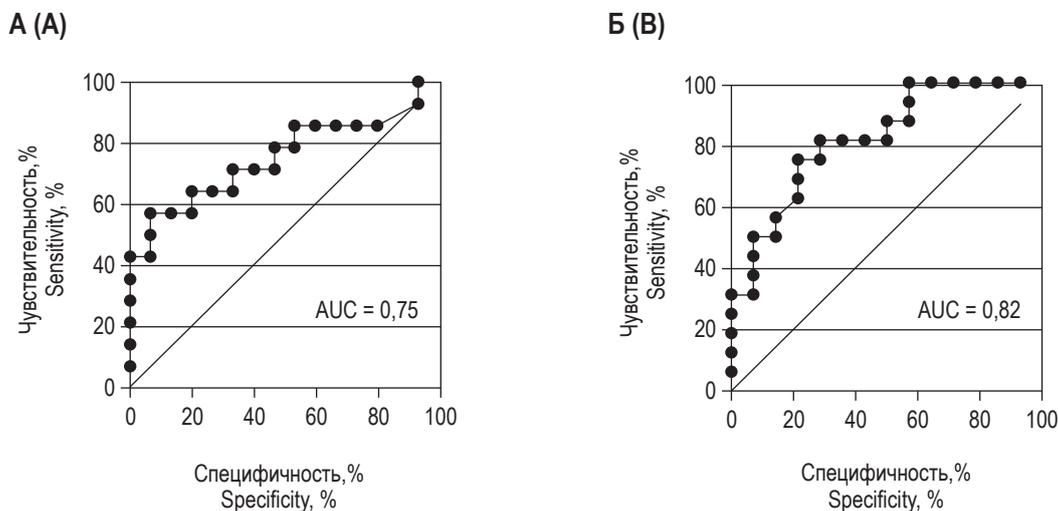


Рисунок 2. Значимость индекса $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ в качестве монопредиктора (А) и в комбинации с NIHSS (Б) в раннем прогнозе 3-месячного неблагоприятного исхода инсульта (ROC-анализ)

Figure 2. Significance of $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ ratio as monopredictor (A) and in combination with NIHSS (B) in the early prognosis of adverse 3-month stroke outcome (ROC-analysis)

приятным ($mRs > 3$) 3-месячным исходом. Поскольку неблагоприятные исходы развивались преимущественно у пациентов с ИИ средней и тяжелой степени тяжести, анализ проводился в группе пациентов с $NIHSS \geq 8$. Неблагоприятные

исходы в этой группе регистрировались практически у половины пациентов ($n = 21/45$), включая 10 случаев летального исхода (28-сут. летальность) и 11 – грубой инвалидизации. По сравнению с донорами обе группы характеризовались однона-

правленными изменениями (рис. 1), в частности возрастанием доли $CD4^+CD25^{hi}$ и снижением относительного содержания $CD4^+IFN\gamma^+T$ -клеток. Тем не менее пациенты с благоприятными исходами характеризовались большей выраженностью указанных изменений. В результате относительное содержание $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток в группе с благоприятным исходом было выше (на уровне тенденции), а содержание $CD4^+IFN\gamma^+T$ -клеток — достоверно ниже, чем в группе с неблагоприятным исходом. Соответственно, индекс $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ в группе с неблагоприятным исходом 4-кратно превышал аналогичный показатель в группе с хорошим неврологическим восстановлением ($p_U < 0,05$).

Полученные данные позволили предположить, что соотношение $CD4^+IFN\gamma^+$ и $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток может являться прогностическим биомаркером и использоваться для ранней оценки риска неблагоприятного исхода. Чтобы проверить это предположение, был проведен ROC-анализ. Параллельно с индексом соотношения $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ мы также оценили прогностическую значимость ряда других клинико-лабораторных показателей — NIHSS, СРБ и НЛИ (табл. 4). Площадь под ROC-кривой (AUC) для индекса $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ составила 0,75, соответствуя хорошему качеству прогноза, и при значении индекса $> 1,19$ неблагоприятный исход прогнозировался с чувствительностью 73% и специфичностью 67% (табл. 4, рис. 2А).

Характерно, что оценка NIHSS, СРБ и НЛИ в качестве монопредикторов исхода (табл. 4) характеризовалась меньшей прогностической значимостью — площадь под ROC-кривой варьировала от 0,7 до 0,72. В то же время комбинация индекса $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ с NIHSS улучшала качество прогноза до уровня «очень хорошего». В этом случае площадь под кривой была 0,82, и неблагоприятный исход прогнозировался с чувствительностью 79% и специфичностью 75% (рис. 2Б).

Обсуждение

Проведенные в настоящей работе исследования показывают, что тяжесть ИИ ассоциирована с более выраженной воспалительной реакцией. Это подтверждается возрастанием показателей системного воспалительного ответа (лейкоцитоза, НЛИ и уровня СРБ) и частоты неблагоприятных исходов по мере утяжеления инсульта и хорошо согласуется с данными литературы [1]. Индуцированный ишемическим повреждением иммунный ответ лежит в основе локального и системного воспаления и является важнейшим патогенетическим звеном церебрального инсульта [12]. Умеренная воспалительная реакция

необходима для ограничения очага повреждения, защиты от патогенов и активации репаративных процессов. В то же время избыточное воспаление приводит к дополнительному повреждению нервной ткани и является причиной постинсультной иммуносупрессии, обуславливающей инфекционные осложнения и ассоциированную с ними летальность [6, 16]. Поскольку различные субпопуляции Т-клеток вовлечены в модуляцию воспалительной реакции [2, 4], баланс Т-клеток, усиливающих и подавляющих воспалительную реакцию, может быть биомаркером тяжести инсульта, выраженности воспалительного ответа и эффективности неврологического восстановления.

Действительно, полученные результаты показали, что развитие системной воспалительной реакции в первые 24-48 ч после ИИ сопровождается выраженными изменениями в содержании и балансе Т-клеток с регуляторной активностью, в частности снижением клеток с фенотипом Th1 ($CD4^+IFN\gamma^+$) и возрастанием Т-клеток с фенотипом Treg ($CD4^+CD25^{hi}$). Увеличение в циркуляции Treg в остром периоде ИИ согласуется с данными других авторов, интерпретирующих указанные изменения в качестве протективного механизма [9, 18]. Выявленная нами прямая взаимосвязь $CD4^+IFN\gamma^+T$ -клеток с уровнем СРБ и НЛИ и обратная зависимость с количеством $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток свидетельствуют о возможном участии этих субпопуляций, соответственно, в позитивной и негативной регуляции системного воспалительного ответа. Кроме того, обнаруженная обратная взаимосвязь между содержанием $CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+IFN\gamma^+T$ -клеток позволяет полагать, что $CD4^+CD25^{hi}Treg$ в остром периоде ИИ способны подавлять Th1 ответ.

Важным результатом настоящего исследования является также выявление различий в содержании $CD4^+IFN\gamma^+$ и $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток, у пациентов, оппозитных по 3-месячному исходу. Так, пациенты с неблагоприятным исходом отличаются от оппозитной группы более высоким содержанием $CD4^+IFN\gamma^+T$ -клеток, меньшим количеством $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток и 4-кратно более высоким индексом соотношения этих клеток. Полученные данные являются еще одним аргументом в пользу негативной роли $CD4^+IFN\gamma^+T$ -клеток и позитивной роли $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток в остром периоде ИИ. Следует отметить, что данные об изменениях $IFN\gamma$ продуцирующих $CD4^+T$ -клеток в первые дни после ИИ у человека отсутствуют. Поэтому обнаруженные нами изменения в содержании этих клеток, а также их взаимосвязь с системным воспалением и исходами являются новыми фактами. В экспериментальной модели окклюзии среднемозговой арте-

рии показано, что продуцируемый в селезенке $IFN\gamma$ усиливает вторичное повреждение нервной ткани за счет повышения экспрессии в головном мозге провоспалительного белка IP-10. При этом снижение концентрации $IFN\gamma$ с помощью $IFN\gamma$ -нейтрализующих антител уменьшает объем ишемического поражения мозга и улучшает неврологическое восстановление [14]. Результаты настоящего исследования у человека также свидетельствуют о возможной негативной роли $IFN\gamma$ в остром периоде ИИ. Кроме того, выраженные различия в индексе соотношения $CD4^+IFN\gamma^+$ и $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток в группах с противоположными исходами свидетельствуют о значении данного показателя в качестве потенциального предиктора при оценке риска неблагоприятного исхода. Действительно, проведенный ROC-анализ показал «хорошее» качество прогноза неблагоприятного 3-месячного исхода, основанного на оценке соотношения $CD4^+IFN\gamma^+$ и $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток в качестве монопредиктора, и «очень хорошее»

качество прогноза при комбинации данного показателя с баллом NIHSS.

Прогнозирование исходов инсульта имеет большое значение для оптимизации программ лечения и развития персонализированных подходов к терапии [8]. Наиболее часто для оценки прогноза в мировой практике используется шкала NIHSS. Тем не менее данная шкала не позволяет с высокой долей вероятности оценивать риски неблагоприятного исхода у отдельных больных. Поэтому поиск новых биомаркеров в качестве монопредикторов или в дополнении к шкале NIHSS представляется перспективным направлением исследований [17]. Согласно полученным нами данным, таким биомаркером может быть соотношение клеток с фенотипом Th1 и Treg и комбинация этого индекса с NIHSS. Однако корректная валидация предложенной прогностической модели требует дальнейших исследований на большей выборке.

Список литературы / References

1. Bonaventura A., Liberale L., Vecchié A., Casula M., Carbone F., Dallegri F., Montecucco F. Update on inflammatory biomarkers and treatments in ischemic stroke. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 12, E1967. doi:10.3390/ijms17121967.
2. Brait V.H., Arumugam T.V., Drummond G.R., Sobey C.G. Importance of T lymphocytes in brain injury, immunodeficiency, and recovery after cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2012, Vol. 32, no. 4, pp. 598-611.
3. Gorelick P.B. The global burden of stroke: persistent and disabling. *Lancet Neurol.*, 2019, Vol. 18, no. 5, pp. 417-418.
4. Gu L., Jian Z., Sary C., Xiong X. T cells and cerebral ischemic stroke. *Neurochem. Res.*, 2015, Vol. 40, no. 9, pp. 1786-1791.
5. Heusinkveld M., de Vos van Steenwijk P.J., Goedemans R., Ramwadhoebe T.H., Corter A., Welters M.J., van Hall T., van der Burg S.H. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by $CD4^+$ Th1 cells. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 3, pp. 1157-1165.
6. Jayaraj R.L., Azimullah S., Beiram R., Jalal F.Y., Rosenberg G.A. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *J. Neuroinflammation*, 2019, Vol. 16, no. 1, 142. doi: 10.1186/s12974-019-1516-2.
7. Kleinschnitz C., Kraft P., Dreykluft A., Hagedorn I., Gobel K., Schuhmann M.K. Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 4, pp. 679-691.
8. Lai Y.J., Hanneman S.K., Casarez R.L., Wang J., McCullough L.D. Blood biomarkers for physical recovery in ischemic stroke: a systematic review. *Am. J. Transl. Res.*, 2019, Vol. 11, no. 8, pp. 4603-4613.
9. Liesz A., Kleinschnitz C. Regulatory T cells in post-stroke immune homeostasis. *Transl. Stroke Res.*, 2016, Vol. 7, no. 4, pp. 313-321.
10. Okeke E.B., Uzonna J.E. The pivotal role of regulatory T cells in the regulation of innate immune cells. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 680. doi:10.3389/fimmu.2019.00680.
11. Prajeeth C.K., Lohr K., Floess S., Zimmermann J., Ulrich R., Gudi V., Beineke A., Baumgartner W., Muller M., Huehn J., Stangel M. Effector molecules released by Th1 but not Th17 cells drive an M1 response in microglia. *Brain Behav. Immun.*, 2014, Vol. 37, pp. 248-259.
12. Rayasam A., Hsu M., Kijak J.A., Kissel L., Hernandez G., Sandor M., Fabry Z. Immune responses in stroke: how the immune system contributes to damage and healing after stroke and how this knowledge could be translated to better cures? *Immunology*, 2018, Vol. 154, no. 3, pp. 363-376.
13. Saino O., Taguchi A., Nakagomi T., Nakano-Doi A., Kashiwamura S., Doe N., Nakagomi N., Soma T., Yoshikawa H., Stern D.M., Okamura H., Matsuyama T. Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke. *J. Neurosci. Res.*, 2010, Vol. 88, pp. 2385-2389.
14. Seifert H.A., Collier L.A., Chapman C.B., Benkovic S.A., Willing A.E., Pennypacker K.R. Pro-inflammatory interferon gamma signaling is directly associated with stroke induced neurodegeneration. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 2014, Vol. 9, no. 5, pp. 679-689.

15. Shi K., Wood K., Shi F.-D., Wang X., Liu Q. Stroke-induced immunosuppression and poststroke infection. *Stroke Vasc. Neurol.*, 2018, Vol. 3, no. 1, pp. 34-41.
16. Vogelgesang A. Catecholamines, steroids and immune alterations in ischemic stroke and other acute diseases. *Aging Dis.*, 2014, Vol. 5, no. 5, pp. 327-339.
17. Wouters A., Nysten C., Thijs V., Lemmens R. Prediction of outcome in patients with acute ischemic stroke based on initial severity and improvement in the first 24 h. *Front. Neurol.*, 2018, Vol. 9, 308. doi: 10.3389/fneur.2018.00308.
18. Yan J., Read S.J., Henderson R.D., Hull R., O'Sullivan J.D., McCombe P.A., Greer J.M. Frequency and function of regulatory T cells after ischaemic stroke in humans. *J. Neuroimmunol.*, 2012, Vol. 243, no. 1-2, pp. 89-94.
19. Zouggar Y., Ait-Oufella H., Waeckel L., Vilar J., Loinard C., Cochain C., Recalde A., Duriez M., Levy B.I., Lutgens E., Mallat Z., Silvestre J.S. Regulatory T cells modulate postischemic neovascularization. *Circulation*, 2009, Vol. 120, no. 14, pp. 1415-1425.

Авторы:

Морозов С.А. — врач-иммунолог научно-консультативного отдела Клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

Пронкина Н.В. — к.б.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии Клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Штоббе А.А. — к.м.н., заведующая отделением неврологии МБУЗ «Городская клиническая больница № 1», г. Новосибирск, Россия

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

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

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

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

Authors:

Morozov S.A., Clinical Immunologist, Scientific Advisory Department, Clinic for Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Pronkina N.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Clinical Immunology, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shtobbe A.A., PhD (Medicine), Head, Department of Neurology, City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

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

Shevela E.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Поступила 03.04.2020
Принята к печати 23.04.2020

Received 03.04.2020
Accepted 23.04.2020

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ОЦЕНКЕ ХРОНИЧЕСКОГО БОЛЕВОГО СИНДРОМА

Мягкова М.А.¹, Петроченко С.Н.¹, Орлова Е.А.¹, Крылов А.С.¹,
Мосейкин И.А.²

¹ ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Хроническая боль в организме человека остается сложной задачей для диагностики. Она проявляется многокомпонентными симптомами и приводит к нарушению регуляции многих биохимических систем. Для оценки боли перспективными являются методы, основанные на измерении факторов нейрогуморальной регуляции, принимающих участие в передаче болевых сигналов. К ним относятся иммунологические показатели, такие как естественные антитела (е-Ат), которые могут специфически взаимодействовать с эндогенными биорегуляторами болевых импульсов (ЭБ), в частности с серотонином, дофамином, и модулировать процесс развития боли. Метаболизм антител характеризуется более длительной циркуляцией в кровотоке по сравнению с самими ЭБ. Поэтому содержание е-Ат к ЭБ отражает долговременные изменения в организме при развитии хронической боли. Выявление взаимосвязи их уровня с динамикой процесса лечения позволит установить прогностическую роль иммунологических показателей в объективизации болевого статуса пациентов.

В работе обследовано 136 больных (70 женщин и 66 мужчин) с хроническим болевым синдромом. Пациентам проводили определение е-Ат к дофамину, серотонину и опрос по визуально-аналоговой шкале для оценки интенсивности боли. Измерение показателей выполняли в динамике на 1-й, 10-й и 21-й день лечения.

В результате исследования установлено значимое снижение интенсивности боли на 63% у женщин и на 71% у мужчин. Уровни е-Ат для пациентов, поступивших на лечение, изначально были определены в основном как повышенные и высокие. Динамика изменения е-Ат имела разнонаправленный характер. На 21 день выявлено увеличение встречаемости нормальных уровней е-Ат к серотонину у 52% женщин и у 59% мужчин. Содержание е-Ат к дофамину в этот период регистрировали на нормальном уровне у 56% женщин, а для 50% мужчин он оставался на повышенном уровне и у 17% – высоким.

Таким образом, обследование пациентов с ХБС показало, что на фоне проводимой терапии происходит снижение интенсивности боли, а антитела к регуляторам боли продолжают циркулировать в повышенных концентрациях. Вероятно, поддержание организмом патологически повышенных уровней е-Ат к ЭБ, отражающих содержание самих ЭБ, способствует пролонгации ХБС. Мониторинг индивидуального профиля иммунологических показателей е-Ат к ЭБ у пациентов может иметь прогностическое значение для выбора эффективной, персональной лечебной программы.

Ключевые слова: хронический болевой синдром, серотонин, дофамин, естественные антитела, иммуноферментный анализ

Адрес для переписки:

Петроченко Светлана Николаевна
ФГБУН «Институт физиологически активных веществ»
Российской академии наук
111024, Россия, Москва, ул. Авиамоторная, 51а.
Тел.: 8 (916) 650-96-19.
E-mail: dianark777@mail.ru

Address for correspondence:

Petrochenko Svetlana N.
Institute of Physiologically Active Substances
111024, Russian Federation, Moscow,
Aviamotornaya str., 51a.
Phone: 7 (916) 650-96-19.
E-mail: dianark777@mail.ru

Образец цитирования:

М.А. Мягкова, С.Н. Петроченко, Е.А. Орлова,
А.С. Крылов, И.А. Мосейкин «Иммунологические
показатели в оценке хронического болевого синдрома»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4.
С. 685-692. doi: 10.15789/1563-0625-III-1995
© Мягкова М.А. и соавт., 2020

For citation:

M.A. Myagkova, S.N. Petrochenko, E.A. Orlova, A.S. Krylov,
I.A. Moseykin "Immunological indexes in evaluation of chronic
pain syndrome", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 685-692.
doi: 10.15789/1563-0625-III-1995
DOI: 10.15789/1563-0625-III-1995

IMMUNOLOGICAL INDEXES IN EVALUATION OF CHRONIC PAIN SYNDROME

Myagkova M.A.^a, Petrochenko S.N.^a, Orlova E.A.^a, Krylov A.S.^a, Moseykin I.A.^b

^a Institute of Physiologically Active Substances, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

^b Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Abstract. Chronic pain in humans remains a challenge for diagnosis. It manifests itself as multicomponent symptoms and leads to dysregulation of many biochemical systems. The approaches based on measuring the neurohumoral factors regulating transmission of a pain signal, are promising for the pain evaluation. These include immunological parameters, such as natural antibodies (e-At), which can specifically interact with endogenous bioregulators of pain impulse (EB), especially, with serotonin, dopamine, and modulate the process of pain development. Antibody metabolism is characterized by longer circulation in the bloodstream as compared to EB. Therefore, the content of e-At to EB reflects long-term changes in the body upon development of chronic pain. Detection of relationships between their level and the course of treatment will allow us to establish the prognostic role of immunological parameters in objective assessment of pain status of patients.

The study included 136 patients (70 women and 66 men) with chronic pain syndrome. The patients were subjected to assays of e-At to dopamine, serotonin, and a survey using a visual analogue scale, in order to assess the intensity of pain. The indexes were measured in the course of treatment (1st, 10th, and 21st days).

As a result, a significant decrease in pain intensity was found in 63% of women and in 71% of males. E-At levels in patients admitted for treatment were initially mostly elevated and high. The dynamics of e-At change was multidirectional. On the day 21, an increase in the occurrence of normal levels of e-At to serotonin was detected in 52% of women and in 59% of men. The content of e-At to dopamine in this period was recorded at a normal level in 56% of women, however, being increased in men (50% of cases), with high levels in 17% of males.

Thus, examination of patients with CHD showed that, against the background of ongoing therapy, pain intensity decreases, and antibodies to pain mediators may continue to circulate at elevated concentrations. It is likely that the body maintains pathologically elevated levels of e-At to EB, reflecting the content of EB itself, contributes to prolongation of CHD. Monitoring individual profile of the immunological parameters of e-At to EB in patients may have prognostic value for choosing an effective, personalized treatment program.

Keywords: chronic pain syndrome, serotonin, dopamine, natural antibodies, enzyme immunoassay

Введение

Боль выполняет важную сигнальную функцию в организме, предупреждая о внешнем или внутреннем воздействии повреждающего фактора. Однако во многих случаях действие боли становится патогенным, как, например, при появлении хронической боли. В такой ситуации происходят значительные нейробиохимические сдвиги [19]. Хроническим болевым синдромом (ХБС) страдает значительная часть мирового населения [21, 22]. Число пациентов в России с хронической болью в спине, обращающихся за медицинской помощью, составляет 53% [16]. ХБС является деструктивным сигналом организма, имеющим множество проявлений, включая нейро-иммуно-эндокринную дисрегуляцию. Молекулярные механизмы процессов хронизации и развития ХБС остаются малоизученными [25]. Для качественной терапии ХБС необходимы более глубокое понимание и оценка психоэмоционального состояния пациента, а также создание новых способов объективной диагностики

боли. Это позволит отслеживать динамику болевого синдрома, эффективность лечебного процесса [17, 24]. Наиболее известными являются биохимические методы контроля, включающие измерение уровня болевых или противоболевых медиаторов. Их определение проводят, как правило, с помощью измерения концентрации непосредственно самого эндогенного биорегулятора (ЭБ) [1, 23]. Однако быстрый метаболизм молекул ЭБ ограничивает их выбор в качестве объективного критерия долгосрочной оценки развития болевого синдрома. В генезе хронической боли на первый план выходят изменения в центральной нервной системе, вызванные длительным непрекращающимся потоком болевой импульсации от поврежденного органа [1]. Этот процесс сопровождается нейроиммунным взаимодействием, основанным на связи механизмов регуляции болевой чувствительности и работой иммунокомпетентных клеток организма [4, 12]. Из литературных данных известно, что развитие ряда заболеваний сопровождается изменением факторов гуморального иммунитета, касаю-

шихся продукции естественных антител (е-Ат), специфичных к ЭБ боли [6, 13]. Для хронической боли характерно снижение активности антиноцицептивной системы из-за прогрессирующего истощения в ЦНС нейромедиаторов, таких как норадреналин, серотонин и дофамин [9]. Эти изменения отражаются в продукции (е-Ат). На моделях экспериментальных животных показано образование аутоантител к норадреналину [8], серотонину [7]. Антитела вызывают различный эффект в зависимости от вида патологической боли. Образование антител к ряду эндогенных регуляторов боли обнаружено и у пациентов с дорсалгиями различного генеза [5, 11]. Определены факторы нейрогуморальной регуляции, участвующие в передаче болевого сигнала, является перспективной основой для разработки диагностического метода объективизации боли. Содержание е-Ат отражает долговременные изменения в организме при развитии хронической боли.

Цель работы заключалась в определении уровня естественных антител к биогенным аминам (серотонину и дофамину) у пациентов, страдающих хроническим болевым синдромом, выявлении взаимосвязи изменения их уровня в динамике процесса лечения, установление прогностической роли данных показателей в объективизации болевого статуса пациентов

Материалы и методы

Проведено обследование 136 больных (70 женщин и 66 мужчин) с ХБС в возрасте от 20 до 72 лет (средний возраст 53,47±2,8 года). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных.

Критерии включения: верифицированный диагноз «хроническая дорсалгия пояснично-крестцового отдела». Основная жалоба пациентов – это выраженная боль в поясничном отделе позвоночника давящего характера, усиливающаяся при физической нагрузке. Субъективный уровень боли исследовали с помощью визуально-аналоговой шкалы (ВАШ). На отрезке прямой с 10 делениями больные отмечали интенсивность боли. Ноль соответствовал полному отсутствию боли, слабая боль – 0-2 балла, умеренная боль – 2,1-4 балла, сильная боль – 4,1-6 баллов, сильнейшая боль – 6,1-8 баллов, невыносимая боль – 8,1-10 баллов.

Для проведения иммунохимических исследований применяли твердофазный метод ИФА определения антител к серотонину, дофамину, в сыворотке крови человека, который включает следующие этапы: иммобилизацию комплекса синтетического антигена, состоящего из конъюгата-гаптена производного серотонина, дофамина с полимерным носителем на полистирольном планшете. Связывание указанного

выше антигена со специфическими антителами анализируемого образца. Выявление образовавшегося иммунного комплекса с помощью антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена. Измерение ферментативной активности в образовавшемся иммунном комплексе. Для проведения ИФА использовали «Набор реагентов для иммуноферментного определения антител к эндогенным биорегуляторам в сыворотке крови «АДИМУСТАТ®» (ФСР 2010/08813) (производство «Дианарк»). Синтез конъюгированных антигенов и условия проведения анализа выполняли в соответствии с разработанной нами ранее схемой [14].

Забор образцов крови для анализа (5 мл) осуществляли у всех пациентов при поступлении в стационар на госпитализацию. Для получения сыворотки пробирки с образцами центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин (центрифуга CentrifugeCM-6M, “ELMI Ltd”, Латвия). Далее образцы крови хранили при температуре -20 °С до момента тестирования.

Измерение всех показателей проводили в первый день госпитализации, в середине курса (на 10-й день) и при завершении лечения (21-й день).

Для установления различий и изучения динамики содержания е-Ат к ЭБ пациентов разделили на группы в зависимости от значения показателя оптической плотности (ОП). Группе «норма» соответствовал интервал значений ОП равной $X_{ср} \pm \sigma$. Группе с повышенным содержанием е-Ат соответствовал интервал показателей ОП от $(X_{ср} + \sigma)$ до $(X_{ср} + 3\sigma)$. В группу с пониженным содержанием е-Ат вошли пациенты, имеющие показатель ОП ниже $(X_{ср} - \sigma)$, а группа с высоким содержанием е-Ат состояла из пациентов со значением ОП выше $(X_{ср} + 3\sigma)$.

Статистическую обработку результатов осуществляли в программе Statistica 6.0. Оценку эмпирических распределений полученных результатов проводили с использованием критерия нормальности. При нормальном распределении значимость различий данных в обследуемых группах пациентов определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Для распределений данных, имеющих отличия от нормального, применяли таблицы сопряженности с использованием критерия χ^2 . Различия между обследованными группами пациентов считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Основным показателем эффективности лечения ХБС является снижение интенсивности боли. Мониторинг интенсивности боли проводили методом опроса, в котором пациенты оценивали уровень ощущаемой ими боли по визуально-аналоговой шкале (ВАШ) в начале, середине и в конце лечения. В процессе лечения установлено

снижение числа пациентов с высокими баллами по ВАШ и увеличивается их количество с низкими баллами, как в группах мужчин, так и женщин. Наибольшая разница в гендерных группах отмечена в конце лечения. Об отсутствии боли (0 баллов) к концу лечения сообщили 40% женщин и 53% мужчин.

Проведено определение содержания е-Ат к серотонину и дофамину в группах пациентов мужчин и женщин с ХБС в динамике лечения (рис. 1, 2).

По результатам ИФА для е-АТ к серотонину и дофамину установлено, что уже в начале обследования их содержание было выше нормы у большинства пациентов, как мужчин, так и женщин. Показатели находились в диапазоне повышенных или высоких значений.

Анализ обобщенных данных по относительному содержанию антител каждой специфичности внутри гендерного профиля, а также динамики их изменения в процессе лечения выявил ряд особенностей. У женщин в 1 день обследования обнаружено повышенное содержание е-Ат к серотонину и дофамину в среднем для 47-56% пациентов. Высокий уровень е-Ат к серотонину обнаружен у 29% пациентов этой группы, в то время как высокое содержание антител к дофамину встречалось только у 2,5% женщин.

У 50% мужчин в среднем по группе встречались повышенные уровни антител к дофамину и серотонину, а у 30% обнаружено высокое содержание е-Ат к серотонину, по сравнению с 10%

пациентов, имеющих высокий уровень е-Ат к дофамину.

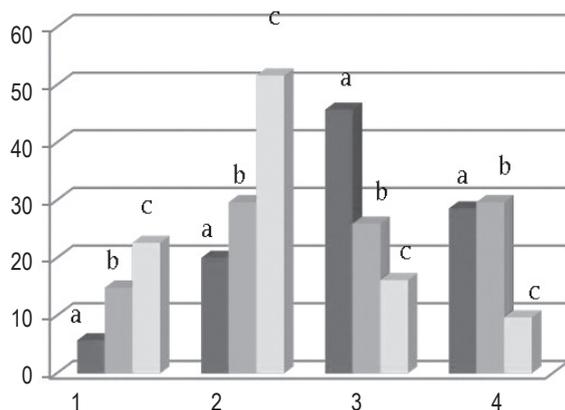
Обнаружены различия профилей е-Ат к биогенным аминам в группах мужчин и женщин. Содержание е-Ат к дофамину у женщин более сдвинуто в сторону повышенных (54%) и нормальных значений (39%), а у мужчин – в сторону высоких (12%) и повышенных (52%). При этом е-Ат к серотонину у мужчин встречались с одинаковой частотой (33%), у женщин преобладали повышенные уровни (46%) над высокими (29%).

Анализ динамики изменения уровней е-Ат в процессе лечения представлен в таблицах 1 и 2.

Обсуждение

В настоящее время в литературе появляется все больше данных о важной роли антител как участников нейроиммунных взаимодействий [6, 20, 15]. В частности, изучается вклад е-Ат к ЭБ в регуляцию острого и хронического болевого синдрома. Установлено, что при активной иммунизации животных, антитела, образующиеся к катехоламинам, способствуют усилению и пролонгации боли [3, 8]. У человека роль антител в регуляции болевых состояний изучена мало. Нами проведено исследование содержания е-Ат к биогенным аминам (серотонину и дофамину) у пациентов с болью в спине в период обострения. Анализ полученных в работе данных проводили отдельно для группы мужчин женщин, с целью выявления возможной связи исследуемых пока-

А (А)



Б (Б)

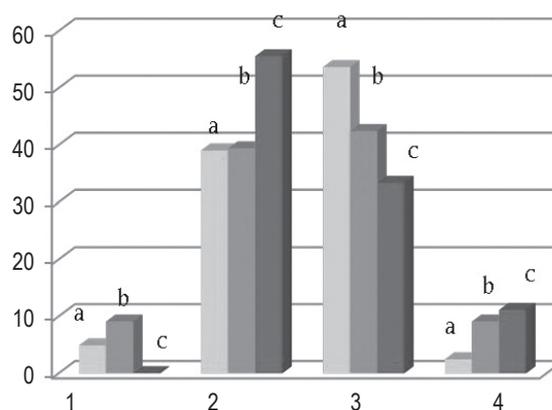


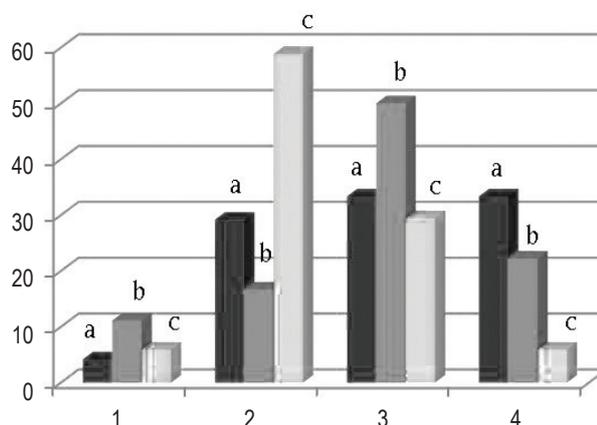
Рисунок 1. Распределение пациенток-женщин с ХБС по содержанию е-Ат к серотонину (А) и дофамину (Б) в 1 “а”, 10 “б”, 21 “с” дни обследования

Примечание. По оси ординат: % пациентов. По оси абсцисс: 1 – количество пациентов с пониженным уровнем антител; 2 – количество пациентов с нормальным уровнем антител; 3 – количество пациентов с повышенным уровнем антител; 4 – количество пациентов с высоким уровнем антител на 1, 10 и 21 день исследования.

Figure 1. Distribution of female patients with CHD by the content of e-Ab, serotonin (A) and dopamine (B) on days 1 “a”, 10 “b”, 21 “c” of the examination

Note. The ordinate axis: % of patients. The abscissa axis represents: 1, the number of patients with a reduced level of antibodies; 2, the number of patients with a normal level of antibodies; 3, the number of patients with elevated level of antibodies; 4, the number of patients with high level of antibodies on the 1st, 10th and 21st day of the study.

А (А)



Б (Б)

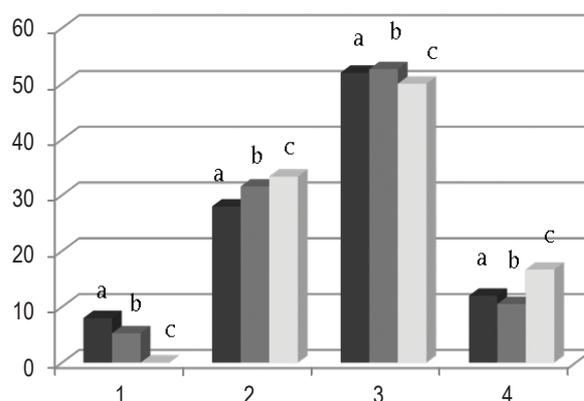


Рисунок 2. Распределение пациентов-мужчин с ХБС по содержанию е-Ат к серотонину (А) и дофамину (Б) в 1 “а”, 10 “б”, 21 “с” дни обследования

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Distribution of male patients with CHD according to the content of e-Ab to serotonin (A) and dopamine (B) on days 1 “a”, 10 “b”, 21 “c” of the examination

Note. As for Figure 1.

ТАБЛИЦА 1. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИТЕЛ (ΔOP) У ЖЕНЩИН ЧЕРЕЗ 21 ДЕНЬ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 1. INDIVIDUAL CHANGES IN THE CONTENT OF THE STUDIED ANTIBODIES (ΔOD) IN WOMEN AFTER 21 DAYS OF TREATMENT

е-Ат n-Ab	Количество пациентов, % Number of patients, %		
	Изменение уровня е-Ат Changes in the level of n-Ab		
	Повысился Increased	Понижился Decreased	Не изменился No change
к серотонину to serotonin	4%	63%	33%
к дофамину to dopamine	16%	16%	68%

ТАБЛИЦА 2. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИТЕЛ (ΔOP) У МУЖЧИН ЧЕРЕЗ 21 ДЕНЬ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 2. INDIVIDUAL CHANGES IN THE CONTENT OF THE STUDIED ANTIBODIES (ΔOD) IN MEN AFTER 21 DAYS OF TREATMENT

е-Ат n-Ab	Количество пациентов, % Number of patients, %		
	Уровень е-Ат Level of the n-Ab		
	Повысился Increased	Понижился Decreased	Не изменился No change
к серотонину to serotonin	12%	24%	64%
к дофамину to dopamine	6%	12%	82%

зателей и пола. Ранее в ряде работ по болевому синдрому были установлены значимые половые различия в восприятии боли по психологическим и физиологическим показателям [18].

Для сравнительной оценки эффективности лечения ХБС использовали общепринятый на сегодняшний день метод определения субъективного уровня боли пациентов с помощью визуально-аналоговой шкалы. В среднем к концу лечения болевой синдром снизился на 63% у женщин и 71% у мужчин от исходного уровня.

Известно, что хроническую боль сопровождают стресс и эмоциональное напряжение. Они вызывают повышение секреции биогенных аминов в крови, которые играют ведущую роль в патогенезе болезненных и стрессовых состояний [5, 7]. Согласно результатам нашего исследования, содержание антител к ЭБ у большинства пациентов в начале обследования было выше нормы в обоих гендерных группах. Это свидетельствует о том, что у данных пациентов уже сформировался дисбаланс медиаторов, и иммунная система ответила на это повышенной продукцией е-Ат к регуляторам боли. При анализе данных е-Ат к биогенным аминам обнаружена положительная динамика в ходе лечения. Так, встречаемость нормального содержания е-Ат к серотонину к 21 дню увеличилась на 32% у женщин и на 30% у мужчин. Показатели положительной динамики регистрировались более чем у половины пациентов (у 52% женщин и 59% мужчин). Этот факт может быть связан с уменьшением интенсивности болевой импульсации у данных пациентов. С началом лечебных мероприятий отмечается падение уровня тревоги и стресса. Проводимая противоболевая терапия способствует снижению продукции серотонина в периферических терминалях.

Нормальные уровни е-Ат к дофамину установлены для 56% женщин. В отличие от этого у мужчин е-Ат к дофамину выявлялись в основном на повышенном (у 50%) и высоком уровне (у 17%). По-видимому, такое распределение связано с индивидуальной психоэмоциональной реакцией на уровень боли и эффективность его купирования. Подтверждением тому служат литературные данные об увеличенной продукции катехоламинов при ХБС и снижении их выработки после противоболевой терапии [22] из-за проявления выраженного психоэмоционального напряжения, изначально связанного с хронической болью. Кроме того, показано, что в организме пути реализации ХБС и депрессии объединяются общим нейромедиаторным механизмом с участием молекул катехоламинов [24, 25].

Обобщая вышеизложенное, можно отметить, что использование новых иммунологических маркеров для оценки боли позволило установить при ХБС присутствие дисрегуляции в системе биогенных аминов, отражающейся в повышении

уровня е-Ат к серотонину и дофамину до лечения и нормализующейся в процессе проводимой терапии. Установлены отличия профилей е-Ат к серотонину и дофамину в зависимости от пола пациентов.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что у пациентов ХБС, на фоне проводимой терапии, в крови продолжают циркулировать антитела к регуляторам боли в патологически повышенных концентрациях. При этом происходит значительное снижение интенсивности боли. В литературе подобное отсутствие связи между уровнем боли, его динамикой и объективными показателями состояния организма все чаще связывают с существенным вкладом эмоций в ХБС [24].

Следует отметить, что длительное поддержание патологически повышенных уровней е-Ат к ЭБ может способствовать пролонгации ХБС [19, 21], составлять риск возникновения новых острых состояний и препятствовать выздоровлению, выражаемому в балансе биорегуляторов и антител к ним. В связи с этим важно проводить контроль содержания е-Ат к ЭБ у пациентов с хронической болью с прогностической точки зрения. Такой мониторинг индивидуального профиля Ат к ЭБ пациента дает более объективную картину болевого статуса организма, а это, в свою очередь, позволяет подбирать более эффективную, персональную лечебную программу.

Этические нормы

Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующих обновлениях, и одобрены локальным биоэтическим комитетом Института физиологически активных веществ РАН (г. Черноголовка, Московская обл.).

Информированное согласие

Каждый участник исследования представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования.

Финансирование

Работа выполнена в соответствии с исследованием, согласно Госрегистрации № 01200952666.

Конфликт интересов

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

Благодарности

Авторы благодарят младшего научного сотрудника З.В. Боброву за помощь при подготовке статьи.

Список литературы / References

1. Баринов А.Н. Современный подход к диагностике и лечению боли в спине // Русский медицинский журнал, 2013, спец. выпуск. С. 8-15. [Barinov A.N. Modern approach to the diagnosis and treatment of back pain. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2013, *Special Iss.*, pp. 8-15. (In Russ.)]
2. Барулин А.Е., Курушина О.В., Калинин Б.М., Черноволенко Е.П. Хроническая боль и депрессия // Лекарственный вестник, 2016. Т. 10, № 61. С. 3-10. [Barulin A.E., Kurushina O.V., Kalinchenko B.M., Chernovolenko E.P. Chronic pain and depression. *Lekarstvennyy vestnik = Medicinal Bulletin*, 2016, *Vol. 10, no. 61*, pp. 3-10. (In Russ.)]
3. Борисова Э.Г., Никитенко В.В. Изучение катехоламинов при хронических болевых синдромах полости рта // Российский журнал боли, 2016. № 2. С. 8-9. [Borisova E.G., Nikitenko V.V. The study of catecholamines in chronic pain syndromes of the oral cavity. *Rossiyskiy zhurnal boli = Russian Journal of Pain*, 2016, *no. 2*, pp. 8-9. (In Russ.)]
4. Давыдова Т.В., Колобов В.В., Горбатов В.Ю., Захарова И.А., Ветрилэ Л.А., Фомина В.Г., Феденко А.М. Антитела к глутамату, нейродегенеративные повреждения головного мозга. Перспективы иммунотерапии // Патогенез, 2012. Т. 10, № 3. С. 26-31. [Davydova T.V., Kolobov V.V., Gorbатов V.Yu., Zakharova I.A., Vetrile L.A., Fomina V.G., Fedenko A.M. Antibodies to glutamate, neurodegenerative brain damage. Immunotherapy prospects. *Patogenez = Pathogenesis*, 2012, *Vol. 10, no. 3*, pp. 26-31. (In Russ.)]
5. Захарова И.А., Ветрилэ С.Т., Швец В.В. Хронический болевой синдром при остеохондрозе позвоночника: аутоантитела к нейромедиаторам // Российский журнал боли, 2015. Т. 1, № 46. С. 65-66. [Zakharova I.A., Vetrile S.T., Shvets V.V. Chronic pain syndrome in spinal osteochondrosis: autoantibodies to neurotransmitters. *Rossiyskiy zhurnal boli = Russian Journal of Pain*, 2015, *Vol. 1, no. 46*, pp. 65-66. (In Russ.)]
6. Игонькина С.И., Кукушкин М.Л., Ветрилэ Л.А., Решетняк В.К. Антитела к нейромедиаторам антиноцицептивной системы усиливают и пролонгируют невропатическую боль // Российский журнал боли, 2014. Т. 1, № 42. С. 15-16. [Igonkina S.I., Kukushkin M.L., Vetrile L.A., Reshetnyak V.K. Antitel to the neurotransmitters of the antinociceptive system strengthen and prolong neuropathic pain. *Rossiyskiy zhurnal boli = Russian Journal of Pain*, 2014, *Vol. 1, no. 42*, pp. 15-16. (In Russ.)]
7. Игонькина С.И., Ветрилэ Л.А., Давыдова Т.В., Фомина В.Г. Пронотицицептивный и антиноцицептивный эффекты антител к серотонину // Российский журнал боли, 2014. Т. 1, № 42. С. 14-15. [Igonkina S.I., Vetrile L.A., Davydova T.V., Fomina V.G. Pronociceptive and antinociceptive effects of antibodies to serotonin. *Rossiyskiy zhurnal boli = Russian Journal of Pain*, 2014, *Vol. 1, no. 42*, pp. 14-15. (In Russ.)]
8. Игонькина С.И., Ветрилэ Л.А., Кукушкин М.Л. Влияние антител к норадреналину на развитие невропатической боли // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2016. Т. 162, № 12. С. 678-681. [Igonkina S.I., Vetrile L.A., Kukushkin M.L. The effect of antibodies to norepinephrine on the development of neuropathic pain. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016, *Vol. 162, no. 12*, pp. 678-681. (In Russ.)]
9. Каракулова Ю.В. Серотонинергические механизмы хронификации головной боли напряжения // Российский журнал боли, 2017. Т. 1, № 52. С. 9-10. [Karakulova Yu.V. Serotonergic mechanisms of chronification of tension headache. *Rossiyskiy zhurnal boli = Russian Journal of Pain*, 2017, *Vol. 1, no. 52*, pp. 9-10. (In Russ.)]
10. Кучаева А.В. Биопсихосоциальный анализ фармакотерапии хронического болевого синдрома при депрессии // Биотехнологии и медицина, 2013. № 8. С. 7-9. [Kuchaeva A.V. Biopsychosocial analysis of pharmacotherapy of chronic pain syndrome in depression. *Biotehnologii i meditsina = Biotechnology and Medicine*, 2013, *no. 8*, pp. 7-9. (In Russ.)]
11. Левашова А.И., Морозова В.С., Польшвиная О.Ю., Петроченко С.Н., Мягкова М.А., Мосейкин И.А. Сравнительный анализ интенсивности болевого синдрома и иммунохимических показателей – уровней естественных антител у больных хронической дорсалгией // Биологические мембраны, 2014. Т. 31, № 3. С. 218-225. [Levashov A.I., Morozova V.S., Polyvianaya O.Yu., Petrochenko S.N., Myagkova M.A., Moseykin I.A. Comparative analysis of the intensity of pain syndrome and immunochemical parameters – the levels of natural antibodies in patients with chronic dorsalgia. *Biologicheskie membrany = Biological Membranes*, 2014, *Vol. 31, no. 3*, pp. 218-225. (In Russ.)]
12. Манжуло И.В., Дюйзен И.В. Нейрохимические изменения в ростральном вентромедиальном ядре продолговатого мозга крысы при развитии невропатического болевого синдрома // Нейрохимия, 2015. № 3. С. 259-367. [Manzhulo I.V. Duisen I.V. Neurochemical changes in the rostral ventromedial nucleus of the medulla of the rat with the development of neuropathic pain syndrome. *Neyrokhimiya = Neurochemistry*, 2015, *no. 3*, pp. 259-367. (In Russ.)]
13. Мягкова М.А., Морозова В.С. Естественные антитела и их физиологические функции // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология, 2014. № 3. С. 75-81. [Myagkova M.A., Morozova V.S. Natural antibodies and their physiological functions. *Immunopatologiya. Allergologiya. Infektologiya = Immunopathology. Allergology. Infectology*, 2014, *no. 3*, pp. 75-81. (In Russ.)]
14. Мягкова М.А., Петроченко С.Н., Морозова В.С. Определение антител к эндогенным биорегуляторам для диагностики функционального состояния организма // Известия АН. Серия химическая, 2018. № 4. С. 762-767. [Myagkova M.A., Petrochenko S.N., Morozova V.S.. Detection of antibodies to endogenous bioregulators for the diagnosis of the functional state of the body. *Izvestiya AN. Seriya khimicheskaya = Proceedings of the Academy of Sciences. Chemical Series*, 2018, *no. 4*, pp. 762-767. (In Russ.)]
15. Пальцев М.А., Полетаев А.Б., Сучков С.В. Аутоиммунитет и аутоиммунный синдром: границы нормы и патологии // Вестник РАМН, 2010. № 8. С. 1-9. [Paltsev M.A., Poletaev A.B., Suchkov S.V. Autoimmunity

and autoimmune syndrome: the limits of the norm and pathology. *Vestnik RAMN = Bulletin of Russian Academy Medical Sciences*, 2010, no. 8, pp. 1-9. (In Russ.)]

16. Подчуфарова Е.В. Актуальные вопросы острой и хронической боли в пояснично-крестцовой области // Неврология. Нейропсихиатрия, психосоматика, 2012. № 1. С. 27-35. [Podchufarova E.V. Topical issues of acute and chronic pain in the lumbosacral region. *Neurologiya. Neyropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology. Neuropsychiatry, Psychosomatics*, 2012, no. 1, pp. 27-35. (In Russ.)]

17. Подчуфарова Е.В., Разумов Д.В. Миогенные боли в спине: клинические особенности, механизмы формирования, лечение // Российский журнал боли, 2011. Т. 3-4, № 32-33. С. 46-54. [Podchufarova E.V., Razumov D.V. Myogenic back pain: clinical features, formation mechanisms, treatment. *Rossiyskiy zhurnal boli = Russian Journal of Pain*, 2011, Vol. 3-4, no. 32-33, pp. 46-54. (In Russ.)]

18. Решетняк В.К. Гендерные различия корково-подкорковых структур мозга, участвующих в восприятии боли // Российский журнал боли, 2014. Т. 1, № 42. С. 20-21. [Reshetnyak V.K. Gender differences in cortical-subcortical brain structures involved in pain perception. *Rossiyskiy zhurnal boli = Russian Journal of Pain*, 2014, Vol. 1, no. 42, pp. 20-21. (In Russ.)]

19. Решетняк В.К., Кукушкин М.Л. Центральные и периферические механизмы физиологической и патологической боли // Клиническая патофизиология, 2015. № 1. С. 1-17. [Reshetnyak V.K., Kukushkin M.L. Central and peripheral mechanisms of physiological and pathological pain. *Klinicheskaya patofiziologiya = Clinical Pathophysiology*, 2015, no. 1, pp. 1-17. (In Russ.)]

20. Третьякова Е.А., Каракулова Ю.В. Клинико-биохимическое исследование механизмов формирования хронической боли в пояснично-крестцовой области // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова, 2011. Т. 9, № 1. С. 58-65. [Tretyakova E.A., Karakulova Yu.V. Clinical and biochemical study of the mechanisms of formation of chronic pain in the lumbosacral region. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2011, Vol. 9, no. 1, pp. 58-65. (In Russ.)]

21. Attal N., Bouhassira D., Baron R. Diagnosis and assessment of neuropathic pain through questionnaires. *Lancet Neurol.*, 2018, Vol. 17, no. 5, pp. 456-466.

22. Johannes C.B., Le T.K., Zhou X., Johnston J.A., Dworkin R.H. The prevalence of chronic pain in United States adults: results of an Internet-based survey. *J. Pain*, 2010, Vol. 11, no. 11, pp. 1230-1239.

23. Hegadoren K.M., O'Donnell T., Lanis R., Coupland N.J., Lacaze-Masmonteil N. The role of beta-endorphin in the pathophysiology of major depression. *Neuropeptides*, 2009, Vol. 43, no. 5, pp. 341-353.

24. Neblett R. Surface electromyographic (SEMG) biofeedback for chronic low back pain. *Healthcare*, 2016, Vol. 4, 27. doi: 10.3390/healthcare4020027.

25. Toll L., Bruchas M.R., Calo' G., Cox B.M., Zaveri N.T. Nociceptin/orphanin FQ receptor structure, signaling, ligands, functions, and interactions with opioid systems. *Pharmacol. Rev.*, 2016, Vol. 68, no. 2, pp. 419-436.

Авторы:

Мягкова М.А. — д.б.н., профессор, заведующая лабораторией иммунохимии ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черногоровка, Московская обл., Россия

Петроченко С.Н. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черногоровка, Московская обл., Россия

Орлова Е.А. — научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черногоровка, Московская обл., Россия

Крылов А.С. — инженер-исследователь лаборатории иммунохимии ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черногоровка, Московская обл., Россия

Мосейкин И.А. — к.м.н., врач-невролог ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Myagkova M.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Compounds, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

Petrochenko S.N., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Compounds, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

Orlova E.A., Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Compounds, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

Krylov A.S., Research Engineer, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Compounds, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

Moseykin I.A., PhD (Medicine), Clinical Neurologist, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Поступила 03.04.2020

Отправлена на доработку 20.04.2020

Принята к печати 06.05.2020

Received 03.04.2020

Revision received 20.04.2020

Accepted 06.05.2020

ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СИНОВИТЕ НА ФОНЕ СИСТЕМНОГО И ВНУТРИСУСТАВНОГО ПРИМЕНЕНИЯ НПВС И ОЗОНА

Порядин Г.В.¹, Захватов А.Н.², Тарасова Т.В.², Хайдар Д.А.²,
Тимошкин В.О.²

¹ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени
Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Резюме. Повреждение суставов инициирует асептическое воспаление, которое, являясь самоподдерживающимся процессом, способствует прогрессирующей посттравматической деструкции тканей не только в патологическом очаге, но и за его пределами, значительно расширяя зону дегенеративных изменений за счет вторичной альтерации. Одному из ведущих звеньев патогенеза воспаления — секретируемым межклеточным медиаторам-цитокинам — принадлежит ведущая роль в поддержании воспалительного процесса и формировании провоспалительного потенциала клеток, что приводит к дезорганизации внеклеточного матрикса и прогрессирующей дезинтеграции хряща. В связи с этим актуальны вопросы разработки и внедрения новых патогенетических методов лечения посттравматического синовита, которые позволят в ранние сроки ограничить площадь вторичной альтерации и активировать репаративные механизмы в очаге повреждения, что улучшит результаты восстановительного периода и повысит эффективность традиционных методов терапии. Многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями доказана эффективность и безопасность озонотерапии, в том числе при дегенеративных заболеваниях суставов. Несмотря на большой объем представленных сведений, освещающих эффективность озонотерапии при суставной патологии, изучению особенностей цитокинового профиля при данном методе лечения посттравматического синовита посвящено недостаточное количество работ, что подчеркивает перспективность дальнейших исследований в этом направлении.

Цель исследования — изучение и оценка влияния внутривенной и внутрисуставной озонотерапии в сочетании с внутрисуставным введением ксефокама на показатели цитокиновой сети у больных с посттравматическим синовитом.

Работа основывается на результатах исследования и лечения 69 больных с травматическими повреждениями коленного сустава, осложненными развитием посттравматического синовита. Формировались 2 исследуемые группы, сопоставимые по объему и характеру травмы сустава. Больные

Адрес для переписки:

Тимошкин Владислав Олегович
ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский
Мордовский государственный университет
имени Н.П. Огарева»
430010, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск,
ул. Пожарского, 4.
Тел.: 8 (987) 682-47-05.
E-mail: vladislav.timoshkin.99@mail.ru

Address for correspondence:

Timoshkin Vladislav O.
N. Ogarev National Research Mordovia State University
430010, Russian Federation, Republic of Mordovia, Saransk,
Pozharsky str., 4.
Phone: 7 (987) 682-47-05.
E-mail: vladislav.timoshkin.99@mail.ru

Образец цитирования:

Г.В. Порядин, А.Н. Захватов, Т.В. Тарасова,
Д.А. Хайдар, В.О. Тимошкин «Цитокиновый статус
при посттравматическом синовите на фоне
системного и внутрисуставного применения нпвс
и озона» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4.
С. 693-702. doi: 10.15789/1563-0625-CSVI1963
© Порядин Г.В. и соавт., 2020

For citation:

G.V. Poryadin, A.N. Zakhvatov, T.V. Tarasova, D.A. Khaydar,
V.O. Timoshkin "Cytokine status in posttraumatic synovitis on
the background of systemic and intra-articular use of NSAID
and ozone", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 693-702.
doi: 10.15789/1563-0625-CSVI1963
DOI: 10.15789/1563-0625-CSVI1963

I группы (35 человек) получали комплексное традиционное лечение. Среди обязательных мероприятий выполнялось удаление пунктата синовиально-геморрагического характера из суставной полости поврежденного сустава. Консервативная терапия включала НПВС, препараты, улучшающие микроциркуляцию, в стандартных дозировках, а также физиотерапевтические методы лечения. У пациентов II группы (34 больных) традиционная терапия дополнялась 10-дневным курсом внутривенной озонотерапии, включающей введение 200 мл 0,9% озонированного раствора NaCl в концентрации 2,0 мг/л ежедневно, наряду с внутрисуставным введением озона концентрацией 5 мг/л в объеме 20 мл с интервалом через день, в количестве 5 процедур. Во время выполнения артроскопии производился проточно-промывной лаваж сустава озонированным раствором NaCl в концентрации 2,0 мг/л. Озонотерапия сочеталась с трехкратным внутрисуставным введением ксефокама в дозе 8 мг 1 раз в 4 дня. На данную технологию лечения получен патент на изобретение (№ 2456988 от 27.07.12 г.). Цитокиновый статус пациентов оценивался по содержанию провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-17, IL-6), регуляторного (IL-2), противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов и рецепторного антагониста IL-1 β методом твердофазного иммуноферментного анализа с индикаторной меткой в виде пероксидазы. Статистический анализ результатов проведен посредством критерия Стьюдента.

Комплексная терапия, включающая внутривенную и внутрисуставную озонотерапию в сочетании с внутрисуставным введением ксефокама способствовала ингибированию воспалительной реакции, что отразилось в динамике депрессии исследуемых цитокинов: синхронному снижению уровня провоспалительных цитокинов одновременно с ограничением роста концентрации противовоспалительных медиаторов воспаления. Итоговые замеры показали снижение содержания провоспалительных цитокинов: TNF α на 24,6% ($p_2 < 0,001$), IL-17 – на 17,3% ($p_2 < 0,01$), IL-6 – на 20,1% ($p_2 < 0,001$), IL-1 β – на 19,1% ($p_2 < 0,001$), уменьшение уровня регуляторного IL-2 – на 25,7% ($p_2 < 0,001$) и противовоспалительных цитокинов IL-10 – на 21,3% ($p_2 < 0,001$), IL-4 – на 25,7% ($p_2 < 0,001$), IL-1ra – на 24,4% ($p_2 < 0,001$), по отношению к данным, полученным при традиционном лечении.

Полученные результаты позволяют оценивать этот метод как высокоэффективный в лечении посттравматического синовита, который способствует подавлению интенсивности воспалительной реакции и уменьшению вторичной альтерации тканевых структур сустава, предупреждая прогрессирование посттравматического остеоартроза.

Ключевые слова: травма сустава, синовит, воспаление, цитокиновый профиль, ксефокам, озонотерапия

CYTOKINE STATUS IN POSTTRAUMATIC SYNOVITIS ON THE BACKGROUND OF SYSTEMIC AND INTRA-ARTICULAR USE OF NSAID AND OZONE

Poryadin G.V.^a, Zakhvatov A.N.^b, Tarasova T.V.^b, Khaydar D.A.^b, Timoshkin V.O.^b

^a N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

^b N. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Abstract. Joint damage initiates aseptic self-sustaining inflammation, which contributes the progression of post-traumatic destruction of tissues not only in the pathological focus, but also outside it, significantly expanding the zone of degenerative changes due to secondary alterations. One of the leading roles in pathogenesis of the inflammation belongs to secreted mediators-cytokines – that impart to the cells the proinflammatory potential and promote the long-term inflammation. These effects lead to disorganization of extracellular matrix and progressive disintegration of cartilage. In this regard, the development and implementation of new pathogenetic treatment methods of post-traumatic synovitis permits to limit the area of secondary alterations and activate reparative mechanisms in the lesion from the early terms, thus potentially improving the results of rehabilitation treatment and increasing efficiency of conventional therapy in post-traumatic synovitis.

Numerous experimental and clinical studies have proven the effectiveness and safety of ozone therapy, e.g., in degenerative joint diseases. Despite extensive data highlighting effectiveness of ozone therapy in articular pathology, the study of cytokine profile when using this treatment of posttraumatic synovitis was performed only in few works, thus emphasizing the prospects for further research in this direction. The study was aimed for investigation of cytokine status in the patients with posttraumatic synovitis subjected to intravenous and intra-articular ozone therapy in combination with intra-articular administration of xefocam.

The work is based on the results of examination and treatment of 69 patients with traumatic injuries of the knee joint, complicated by development of post-traumatic synovitis. Two study groups were formed, comparable in volume and type of joint injury. The patients from group I (35 cases) received conventional combined treatment. Among the mandatory measures, evacuation of a synovial-hemorrhagic punctate was performed from the cavity of damaged joint. Conservative therapy included NSAIDs, medications that improve microcirculation, at standard dosages, as well as physical therapy. In group II (34 patients), traditional therapy was supplemented with a 10-day course of intravenous injectable ozone therapy with 200 ml of NaCl solution at a concentration of 2.0 mg/l daily and intra-articular ozone injection at a concentration of 5 mg/l in a volume of 20 ml 5 times in a day. During arthroscopy, lavage of the joint cavity was performed with ozonated saline solution at a concentration of 2.0 mg/l. The ozone therapy was combined with three intra-articular injections of xefocam at a dose of 8 mg, once every 4 days. A patent for the invention was obtained for this treatment technology (No. 2456988 of 27.07.12). The cytokine profile was evaluated by the content of Pro-inflammatory (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-17), regulatory (IL-2), IL-1 β receptor antagonist, and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines by solid-phase enzyme immunoassay with an indicator label in the form of peroxidase. Statistical analysis of the results was carried out using the Student criterion. Combined therapy of intravenous and intra-articular ozone therapy in combination with intra-articular injections of xefocam contributed to the inhibition of the inflammatory response, which is reflected in the dynamics of depression of the studied cytokines: simultaneous reduction of proinflammatory cytokines with the limitation of the growth of anti-inflammatory mediators. The final measurements showed a decrease in the content of proinflammatory cytokines: TNF α by 24.6% ($p_2 < 0.001$); IL-17, by 17.3% ($p_2 < 0.01$); IL-6, by 20.1% ($p_2 < 0.001$); IL-1 β , by 19.1% ($p_2 < 0.001$), with a decrease in regulatory IL-2 by 25.7% ($p_2 < 0.001$) and anti-inflammatory cytokines IL-10, by 21.3% ($p_2 < 0.001$); IL-4, by 25.7% ($p_2 < 0.001$); IL-1ra, by 24.4% ($p_2 < 0.001$), when compared to the data obtained with conventional treatment. The results obtained allow us to evaluate this method as highly effective in the treatment of post-traumatic synovitis, thus contributing to suppression of inflammatory response and reduces the secondary alteration of joint tissue structures, preventing the progression of post-traumatic osteoarthritis.

Keywords: joint injury, synovitis, inflammation, cytokine profile, xefocam, ozone therapy

Введение

Механическая травма суставов инициирует каскад катаболических реакций воспалительного генеза, реализующихся главным образом посредством активации процессов перекисного окисления липидов и сопровождающихся повышением концентрации цитокинов как на местном уровне, так и в системном кровотоке [8, 15]. Данные сигнальные молекулы модифицируют реактивность тканей и способствуют вовлечению в воспалительный процесс неповрежденных первичной альтерацией тканей, в том числе за счет активации лизосомальных ферментов, стимуляции синтеза медиаторов воспаления, повышающих чувствительность к оксидативному стрессу, что в конечном итоге приводит к расширению очага вторичной деструкции [4, 6, 12].

На фоне длительно сохраняющегося провоспалительного потенциала тканей сустава про-

исходит значительное снижение репаративных процессов, что в конечном итоге приводит к дезорганизации внеклеточного матрикса и прогрессирующей дезинтеграции хряща в совокупности с другими дегенеративно-дистрофическими внутрисуставными изменениями [9, 11].

В связи с этим актуальны вопросы разработки и внедрения новых методов лечения посттравматического синовита, которые позволяют корригировать развивающиеся патологические нарушения и повысят эффективность традиционных методов терапии.

Многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями доказана эффективность и безопасность озонотерапии, которая является современной медицинской технологией с широким спектром неспецифического действия при многих широко распространенных заболеваниях [13, 17]. Озон оказывает антигипоксическое, антибактериальное, противовоспа-

лительное, иммунокорректирующее, обезболивающее, трофическое и метаболическое действие, улучшает микроциркуляцию и реологические свойства крови и способствует оптимизации про- и антиоксидантных систем организма [16].

Опыт мировой литературы подтверждает неоспоримый эффект применения озона в терапевтических дозах при дегенеративных заболеваниях суставов, как в виде системной терапии – внутривенной, так и локальной внутрисуставной и параартикулярной [1, 10]. При этом подавляющее большинство исследователей в качестве критерия оценки результатов используют улучшение субъективных симптомов или же определяемых физикально-клинических объективных данных [14].

Несмотря на большой объем представленных сведений, освещающих эффективность озонотерапии при суставной патологии, изучению особенностей цитокинового профиля при данном методе лечения посттравматического синовита посвящено недостаточное количество работ, что подчеркивает перспективность дальнейших исследований в этом направлении и определяет большую диагностическую значимость оценки развивающихся патологических изменений в суставе и эффективности проводимой терапии.

Учитывая механизмы развития острого асептического посттравматического синовита, представляется целесообразным оценить эффективность озона в сочетании с внутрисуставной НПВС-терапией.

Цель работы – исследовать цитокиновый статус у больных с посттравматическим синовитом при внутривенной и внутрисуставной озонотерапии в комбинации с внутрисуставным введением ксефокама.

Материалы и методы

Представлены результаты открытого исследования и лечения 69 больных обоих полов с травматическими повреждениями коленного сустава, осложненными развитием посттравматического синовита в ГБУЗ РМ «МРЦКБ» с 2012 по 2018 г. Все больные соответствовали возрастному цензу от 20 до 40 лет, без сопутствующих повреждений и заболеваний. Наибольшее количество пострадавших приходилось на спортсменов и лиц, имеющих рабочие специальности. Исследуемые пациенты были информированы о проведении лечебно-диагностических мероприятий и давали на это письменное согласие. Исследования были одобрены локальным этическим комитетом Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ имени Н.П. Огарева» (протокол № 44 от 18.11.2012).

Лица, имеющие соматические эндокринные расстройства, из исследования исключались. Давность травмы варьировала от одного до семи дней. Все больные, которые были включены в исследование, имели показания к выполнению лечебно-диагностической артроскопии. Тактика хирургического вмешательства зависела от характера и объема повреждения (табл. 1).

Сформированы 2 исследуемые группы, которые были сходны по объему и характеру травмы сустава. В I группе (35 больных) проводилось традиционное лечение. Среди обязательных мероприятий выполнялось удаление пунктата синовиально-геморрагического характера из суставной полости поврежденного сустава. С целью уменьшения воспаления и достижения анальгетического эффекта использовались НПВС (кеторол, нимесулид, ксефокам), с целью повышения репаративного потенциала тканей – препараты, улучшающие периферическое кровообращение (трентал, никотиновая кислота, курантил), а также физиотерапевтические методы лечения (лазеротерапия, УВЧ, СМТ) [3].

Во II группе (34 больных) традиционное комплексное лечение дополнялось 10-дневным курсом внутривенной озонотерапии, включающей введение 200 мл 0,9% озонированного раствора NaCl в концентрации 2,0 мг/л ежедневно 1 раз в сутки. Наряду с внутривенной озонотерапией проводилось внутрисуставное введение 20 мл озона в концентрации 5 мг/л через день, в количестве 5 процедур [5]. Во время выполнения артроскопии производился проточно-промывной лаваж сустава озонированным 0,9% раствором NaCl в концентрации 2,0 мг/л. Озонотерапия дополнялась трехкратным внутрисуставным введением ксефокама в дозе 8 мг 1 раз в 4 дня. На данную методику лечения получен патент на изобретение (№ 2456988 от 27.07.12 г.). В исследованиях использовался озонатор – АОТ-Н-01-Арз-01 (г. Арзамас) (сертификационный № РОСС RU. АГ78. Н01324), рекомендованный Ассоциацией российских озонотерапевтов для использования в медицинских целях.

Мониторинг результатов исследования проводился на 7-8 и 15-17 сутки с момента начала лечения.

Исследовались показатели цитокинового статуса, а именно: провоспалительные (TNF α , IL-1 β , IL-17, IL-6), регуляторный (IL-2), противовоспалительные (IL-4, IL-10) цитокины и рецепторный антагонист IL-1 (IL-1ra). В качестве исследуемого материала использовалась сыворотка крови. Замер результатов производился методом твердофазного иммуноферментного

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ В ГРУППАХ С ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИМ СИНОВИТОМ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH POSTTRAUMATIC SYNOVITIS IN GROUPS

Показатель Parameter	I группа Group I	II группа Group II
Общая характеристика General characteristics		
Всего (n) Total (n)	35	34
Мужчины:Женщины (n) Male:Female (n)	23:12	23:11
Возраст (годы) Age (years)	22±7	23±6
Распределение больных по социальному положению Social status of patients		
Рабочие (n) Workers (n)	8 (22,9%)	8 (23,53%)
Служащие (n) Military (n)	2 (5,71%)	3 (8,82%)
Спортсмены (n) Athletes (n)	20 (57,10%)	19 (55,88%)
Студенты (n) Students (n)	5 (14,29%)	4 (11,77%)
Клинический диагноз Diagnosis		
Повреждение суставных поверхностей покровного хряща (n) Damage to the integumentary cartilage (n)	4	3
Повреждение медиального мениска (n) Damage to the medial meniscus (n)	14	15
Повреждение латерального мениска (n) Damage to the lateral meniscus (n)	8	7
Повреждение передней крестообразной связки (n) Damage to the front cruciate ligament (n)	4	5
Повреждение задней крестообразной связки (n) Damage to the posterior cruciate ligament (n)	1	1

анализа анализатором Multiscan с применением набора реагентов фирмы АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). В качестве ферментной индикаторной метки применялась пероксидаза.

Среднестатистические данные биохимических показателей, полученные от 20 здоровых добровольцев, проходивших профилактическое обследование в рамках диспансеризации, были приняты за норму. По гендерному и возрастному распределению сформированная группа сравнения и исследуемые группы пациентов были сопоставимы. Лица, вошедшие в группу сравнения, давали информированное согласие на участие в исследовании. Вычислительный этап и статистический анализ проводились посредством лицензионных программ SPSS-115 for Windows, Statistica 6.0

Результаты

При иммуноферментном анализе цитокинового профиля сыворотки крови у обследованных больных при поступлении определялся высокий уровень цитокинемии. Выявлено наибольшее увеличение содержания провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6, IL-17 по сравнению с контролем (табл. 1). Показатель IL-1 β превышал значения контрольной группы на 206,5% ($p < 0,001$). Наблюдалось значительное увеличение концентрации регуляторного цитокина IL-2 на 345,4% ($p < 0,001$).

Противовоспалительное звено отреагировало на повреждение компенсаторным ростом уровня IL-1ra – на 139,9% ($p < 0,001$), обладающего способностью корректировать продукцию IL-1 β . Отмечалось достоверное повышение concentra-

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ОЗОНОТЕРАПИИ И КСЕФОКАМА НА ДИНАМИКУ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СИНОВИТЕ (TNF α , IL-1 β , IL-17, IL-6) (пг/мл)

TABLE 2. INFLUENCE OF OZONE THERAPY ON THE DYNAMICS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN POSTTRAUMATIC SYNOVITIS (TNF α , IL-1 β , IL-17, IL-6) (pg/ml)

Провоспалительные цитокины Proinflammatory cytokines	Показатели, пг/мл Parameter, pg/ml			
	TNF α	IL-1 β	IL-17	IL-6
Норма Norma (n = 20)	1,20 \pm 0,02	3,22 \pm 0,08	1,96 \pm 0,05	4,87 \pm 0,27
До лечения Before the treatment (n = 69)	4,51 \pm 0,19*	9,87 \pm 0,25*	5,81 \pm 0,13*	16,24 \pm 0,27*
I группа 7-8 сутки Group I 7-8 days (n = 35)	4,98 \pm 0,19 ¹	10,24 \pm 0,30 ¹	7,03 \pm 0,34 ¹	17,93 \pm 0,34 ¹
I группа 15-17 сутки Group I 15-17 days (n = 35)	4,39 \pm 0,31*	9,46 \pm 0,33*	5,45 \pm 0,15*	15,19 \pm 0,38*
II группа 7-8 сутки Group II 7-8 days (n = 34)	5,18 \pm 0,17	9,41 \pm 0,19	6,48 \pm 0,24	16,71 \pm 0,32
II группа 15-17 сутки Group II 15-17 days (n = 34)	3,31\pm0,24*	7,65\pm0,16*	4,51\pm0,23*	12,14\pm0,26*

Примечание. * – достоверность отличия к нормальным величинам при $p < 0,05$; ¹ – достоверность отличия к данным при поступлении $p_1 < 0,05$; жирный шрифт – достоверность по отношению к данным I группы лечения при $p_2 < 0,05$.

Note. *, reliability of differences with normal parameters ($p < 0,05$); ¹, reliability of differences with parameter "before the treatment" ($p_1 < 0,05$); bold font, reliability of differences with significances of the group I ($p_2 < 0,05$).

ции противовоспалительного цитокина IL-4 – на 288,5% ($p < 0,001$). При анализе изменения сы-вороточной концентрации IL-10, также имеющего противовоспалительную направленность, выявлено достоверное увеличение его уровня на 224,0% ($p < 0,001$). Интенсивный рост содержания провоспалительных цитокинов свидетельствует об активации компенсаторных иммунных противовоспалительных реакций как механизмов адаптации, возникающих при посттравматическом синовите.

К 7-8 суткам традиционной терапии содержание цитокинов в сыворотке крови продолжило расти. И на момент мониторинга при сравнении с данными, полученными при поступлении, определялось повышение концентрации провоспалительных цитокинов: TNF α – на 10,4% ($p_1 < 0,05$), IL-6 – на 10,4% ($p_1 < 0,05$), рост уровня IL-17 достигал 21,0% ($p_1 < 0,01$) (табл. 2). Наблюдалось дальнейшее увеличение содержания противовоспалительных и регуляторного медиаторов: IL-2 – на 11,4% ($p_1 < 0,05$), IL-1ra – на 9,9% ($p_1 < 0,05$), IL-4 – на 17,7% ($p_1 < 0,001$). Продолжившийся

рост цитокинов, по-видимому, связан с проводимым оперативным вмешательством, являясь проявлением системной воспалительной реакции в ответ на дополнительную альтерацию тканей сустава.

На заключительных этапах традиционного лечения к 15-17 суткам концентрации цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-17, IL-6 и IL-2 уменьшались ниже значений, зафиксированных при поступлении, однако достоверно от них не отличались ($p_1 > 0,05$), знаменуя, таким образом, наметившуюся тенденцию к ограничению воспалительного процесса. Уровень противовоспалительного цитокина IL-4 и рецепторного антагониста IL-1ra в отличие от провоспалительных, напротив, продолжил расти на 22,3% ($p_1 < 0,001$) и 15,6% ($p_1 < 0,01$) соответственно (табл. 3). Выявленные изменения свидетельствуют о хронизации посттравматического синовита.

Включение в комплекс лечения курсовой внутривенной и внутрисуставной озонотерапии в сочетании с внутрисуставным введением ксефокама на 7-8 сутки достоверно не изменило уровень

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ОЗОНОТЕРАПИИ И КСЕФОКАМА НА ДИНАМИКУ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И РЕГУЛЯТОРНОГО ЦИТОКИНОВ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СИНОВИТЕ (IL-2, IL-1ra, IL-10, IL-4) (пг/мл)

TABLE 3. INFLUENCE OF OZONE THERAPY ON THE DYNAMICS OF ANTI-INFLAMMATORY AND REGULATORY CYTOKINES IN POSTTRAUMATIC SYNOVITIS (IL-2, IL-1ra, IL-10, IL-4) (pg/ml)

Цитокины Cytokines	Показатели, пг/мл Parameter, pg/ml			
	IL-2	IL-1ra	IL-10	IL-4
Норма Norma (n = 20)	2,49±0,03	468,23±18,94	7,34±0,21	2,18±0,05
До лечения Before the treatment (n = 69)	11,09±0,31*	1123,09±39,91*	23,78±0,37*	8,47±0,21*
I группа 7-8 сутки Group I 7-8 days (n = 35)	12,35±0,41 ¹	1234,74±36,29 ¹	24,86±0,43	9,97±0,33 ¹
I группа 15-17 сутки Group I 15-17 days (n = 35)	11,72±0,18*	1298,84±49,82* ¹	25,79±0,41*	10,36±0,19* ¹
II группа 7-8 сутки Group II 7-8 days (n = 34)	9,94±0,34	1279,63±38,59	24,92±0,43	9,41±0,27 ¹
II группа 15-17 сутки Group II 15-17 days (n = 34)	8,71±0,17*	981,35±42,16*	20,29±0,52*	7,72±0,18*

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

цитокинемии в сыворотке крови относительно результатов, полученных при традиционном лечении ($p_2 > 0,05$), за исключением IL-2, который снизился на 19,5% ($p_2 < 0,01$) (табл. 3).

На фоне применения озона и ксефокама к 15-17 суткам в отличие от традиционного лечения происходила синхронная депрессия всех пулов цитокинов. В большей степени подавлялась секреция регуляторного цитокина IL-2 на 25,7% ($p_2 < 0,001$). Наблюдалось снижение уровня как провоспалительных – TNF α на 24,6% ($p_2 < 0,001$), IL-6 на 20,1% ($p_2 < 0,001$), IL-17 на 17,3% ($p_2 < 0,01$), IL-1 β на 19,1% ($p_2 < 0,001$), так и противовоспалительных цитокинов – IL-4 на 25,5% ($p_2 < 0,001$), IL-1ra на 24,4% ($p_2 < 0,001$), IL-10 на 21,3% ($p_2 < 0,001$) относительно значений, полученных при традиционном лечении (табл. 3).

Обсуждение

НПВС в настоящее время являются препаратами первой линии комплексной терапии посттравматических артритов и синовитов и входят в общепринятый стандарт лечения [3]. Реализация

их эффекта осуществляется за счет ингибирования ЦОГ с последующим снижением продукции простагландинов, подавления провоспалительных цитокинов, ингибирования синтеза оксида азота, свободных радикалов, которые имеют большое значение при развитии воспалительной реакции и болевого синдрома, характерных для посттравматического синовита [4].

Однако после проведенного курса традиционной терапии не происходило купирования системного воспалительного процесса, что подтверждается высоким уровнем цитокинемии к концу исследования с тенденцией к снижению концентрации оцениваемых медиаторов. Кроме того, в структуре цитокинового профиля сохранялся резкий дисбаланс уровней IL-1 β и рецепторного антагониста IL-1ra, указывая на нарушение регуляторных механизмов цитокиновой системы и продолжающуюся деструкцию тканей сустава. Активное участие иммунной системы в условиях высокого уровня провоспалительных медиаторов и в то же время значительного роста содержания IL-4 и IL-10 может способствовать инициации реакций, лежащих в основе развития

«вторичного» воспаления, хронизации процесса и обуславливающих прогрессивное течение деструктивно-дегенеративных изменений.

Следует также отметить, что системное применение НПВС оказывает неблагоприятное воздействие на органы кровообращения, дыхательной системы и в большей степени на желудочно-кишечный тракт с формированием НПВС-гастропатии, преимущественно с поражением слизистой оболочки желудка (чаще его антрального отдела), несколько реже — двенадцатиперстной кишки с появлением эрозий и язв, осложняющихся желудочно-кишечными кровотечениями.

Применение озонотерапии в клинической практике связано с его широким спектром фармакологической активности. Этот современный метод физиотерапии применяется при лечении дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов. Так, озонотерапия приводит к уменьшению интенсивности боли при гонартрозе, что связано с ингибированием катаболических хрящевых ферментов и улучшением микроциркуляции и элиминации продуктов, раздражающих болевые рецепторы [7]. Введение озон-кислородной смеси приводит к замедлению распада коллагена, значительно тормозит дегенеративные процессы и склерозирование тканей в поврежденном суставе [10]. На фоне применения внутрисуставной озонотерапии при гонартрозе наблюдается нормализация белкового и липидного состава, восстановление антиоксидантного потенциала синовиальной жидкости и уменьшение хронического воспаления суставных тканей [4]. Доказано улучшение функциональной активности, сокращение сроков временной нетрудоспособности при остеоартрозе коленного сустава при параартикулярном применении озонотерапии, что подчеркивает ее клиническую и экономическую эффективность [1].

Получены данные о повышении эффективности лечения гонартроза при сочетании внутрисуставного введения озона и хондропротекторов [14].

Сочетание НПВС с системной озонотерапией позволит уменьшить вероятность развития гастроэнтерологических осложнений. Это объясняется гастропротекторным эффектом озона, который обусловлен его антихеликобактерным, антигипоксическим и противовоспалительным действием, улучшением микроциркуляции и стимулированием процессов регенерации слизистой оболочки желудка [5].

Однако при анализе доступных к изучению публикаций нам не встретились источники, в ко-

торых оценивается эффективность внутрисуставного введения НПВС в комбинации с озоном у пациентов с посттравматическим синовитом, а результаты динамического мониторинга показателей цитокинового профиля на фоне предложенного метода лечения представляют значимую научно-практическую ценность.

Проведенные нами исследования показали, что применение внутривенной и внутрисуставной озонотерапии, в сочетании с внутрисуставным введением ксефокама дополнительно к стандартному лечению, существенно влияла на выработку цитокинов, вызывая депрессию всех пулов, главным образом провоспалительных, при одновременном подавлении экспрессии противовоспалительных. Вследствие этого уменьшается воспалительная реакция и реализуется возможность ингибирования «вторичной» альтерации тканей сустава, что отразилось в раннем купировании посттравматического синовита и улучшении функционального состояния суставов.

Полученные данные имеют большое прикладное значение в спортивной медицине и реабилитологии, поскольку мониторинг показателей цитокинового профиля у пациентов с посттравматическим синовитом и ранняя патогенетическая коррекция выявляемых нарушений предложенным методом лечения позволят уменьшить проявления симптомов посттравматического синовита и улучшить результаты восстановительного лечения. Системное и внутрисуставное применение озона и ксефокама может служить значимым дополнением к хирургическому лечению у пациентов с различными повреждениями и заболеваниями суставов, нивелируя риск развития осложнений в послеоперационном периоде, способствуя сокращению сроков госпитализации. Сравнительно низкая стоимость использования данной методики лечения может стать альтернативой длительной дорогостоящей НПВС-терапии селективными ингибиторами ЦОГ, хондропротекторами и препаратами гиалуроновой кислоты.

Заключение

Травма коленного сустава инициировала дисбаланс цитокиновой сети, который проявлялся ростом концентрации про- и противовоспалительных цитокинов, играющих в посттравматическом периоде значимую роль во вторичной альтерации хрящевой ткани, синовиальной оболочки и формировании вторичных дегенеративно-деструктивных изменений в суставе.

Включение в комплекс лечебных мероприятий системной внутривенной и внутрисуставной

озонотерапии в сочетании с внутрисуставным введением ксефокама позволило эффективно корректировать показатели цитокинового профиля в посттравматическом периоде, способствуя подавлению интенсивности воспалительной реакции и предупреждая прогрессирование посттравматического остеоартроза.

Перспективность этого терапевтического подхода очевидна, поскольку использование у

больных с посттравматическим синовитом метода комбинированного введения ксефокама и озона, оказывающих потенцируемый плеiotропный эффект на системном и регионарном уровне на узловое звено патогенеза заболевания, позволяет улучшить результаты лечения, способствует компенсации функционального состояния коленного сустава и уменьшению риска возможных осложнений.

Список литературы / References

1. Баранова И.В. Функциональное состояние суставов как критерий оценки эффективности использования озонотерапии в восстановительном лечении больных гонартрозом // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры, 2018. Т. 95, № 3. С. 42-48. [Baranova I.V. Functional state of joints as a criterion for evaluating the effectiveness of ozone therapy in the rehabilitation treatment of patients with gonarthrosis. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kultury = Problems of Balneology, Physiotherapy, and Exercise Therapy*, 2018, Vol. 95, no. 3, pp. 42-48. (In Russ.)]
2. Головач И.Ю., Зафирный И.М., Семенов И.П. Посттравматический остеоартрит: воспалительные, клеточные и биомеханические механизмы прогрессирования заболевания // Новости медицины и фармации, 2016. № 1 (561). С. 16-18. [Golovach I.Yu., Zazirnyy I.M., Semenov I.P. Post-traumatic osteoarthritis: inflammatory, cellular, and biomechanical mechanisms of disease progression. *Novosti meditsiny i farmatsii = News of Medicine and Pharmacy*, 2016, no. 1 (561), pp. 16-18. (In Russ.)]
3. Зайцева Е.М., Кузин А.В. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов при остеоартрите: взгляд сквозь призму патогенеза // Эффективная фармакотерапия, 2019. Т. 15, № 14. С. 26-34. [Zaytseva E.M., Kuzin A.V. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in osteoarthritis: looking through the lens of pathogenesis. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2019, Vol. 15, no. 14, pp. 26-34. (In Russ.)]
4. Захватов А.Н., Беляев А.Н., Тарасова Т.В., Аванесов А.М., Захаркин И.А., Чекмаева А.А. Патогенетическая коррекция цитокинового дисбаланса при экспериментальном посттравматическом артрите // Ульяновский медико-биологический журнал, 2018. Т. 3. С. 101-108. [Zakhvatov A.N., Belyaev A.N., Tarasova T.V., Avanesov A.M., Zakharkin I.A., Chekmaeva A.A. Pathogenetic correction of cytokine imbalance in experimental posttraumatic arthritis. *Ulyanovskiy mediko-biologicheskii zhurnal = Ulyanovsk Medical Biological Journal*, 2018, Vol. 3, pp. 101-108. (In Russ.)]
5. Зоткин Е.Г. Возможности и особенности инъекционной терапии остеоартрита коленных суставов // Фарматека, 2018. № 52. С. 20-25. [Zotkin E.G. Capabilities and features of the injection treatment of osteoarthritis of the knee. *Farmateka*, 2018, no. 52, pp. 20-25. (In Russ.)]
6. Раймуев К.В., Ищенко А.М., Малышев М.Е. Провоспалительные и противовоспалительные цитокины в патогенезе остеоартрита // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, 2018. Т. 10, № 3. С. 19-27. [Raymuev K.V., Ishchenko A.M., Malyshev M.E. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Vestnik Severo-Zapadnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta im. I.I. Mechnikova = Bulletin of I. Mechnikov Northwestern State Medical University*, 2018, Vol. 10, no. 3, pp. 19-27. (In Russ.)]
7. Торгашин А.Н., Родионова С.С., Торгашина А.В. Озонотерапия – недооцененные возможности в лечении заболеваний крупных суставов // Современная ревматология, 2019. Т. 13, № 3. С. 126-129. [Torgashin A.N., Rodionova S.S., Torgashina A.V. Ozone therapy-underestimated opportunities in the treatment of diseases of large joints. *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology*, 2019, Vol. 13, no. 3, pp. 126-129. (In Russ.)]
8. Ширинский В.С., Казыгашева Е.В., Ширинский И.В. Воспаление и иммунитет: роль в патогенезе остеоартрита // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 39-48. [Shirinskiy V.S., Kazygasheva E.V., Shirinskiy I.V. Inflammation and immunity: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 39-48. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-39-48.
9. Carlson A.K., Rawle R.A., Wallace C.W., Brooks E.G., Adams E., Greenwood M.C., Bothner B., June R.K., Olmer M., Lotz M.K. Characterization of synovial fluid metabolomic phenotypes of cartilage morphological changes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, Vol. 27, no. 8, pp. 1174-1184.
10. Chansoria M., Upadhyay S., Panwar S., Shivhare P. Comparative efficacy of intraarticular injection of combination of ozone and steroid and ozone alone in patients with primary knee osteoarthritis: a prospective and randomized clinical analysis. *J. Rec. Advances Pain*, 2016, Vol. 2, pp. 11-14.

11. Chisari E., Yaghmour K.M., Khan W.S. The effects of TNF-alpha inhibition on cartilage: a systematic review of preclinical studies. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, Vol. 28, no. 5, pp. 708-718.
12. Coleman M.C., Buckwalter J.A., Martin J.A. Potential mechanisms of PTA: oxidative stress. *Post-Traumatic Arthritis: Pathogenesis, Diagnosis and Management*, 2015, pp. 211-219.
13. Duymus T.M., Mutlu S., Dernek B., Komur B., Aydogmus S., Kesiktas F.N. Choice of intra-articular injection in treatment of knee osteoarthritis: platelet-rich plasma, hyaluronic acid or ozone options. *Knee Surg Sports Traumatol. Arthrosc.*, 2017, Vol. 25, no. 2, pp. 485-492.
14. Feng X., Beiping L. Therapeutic Efficacy of ozone injection into the knee for the osteoarthritis patient along with oral celecoxib and glucosamine. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2017, Vol. 11, no. 9, pp. 1-3.
15. Goutas A., Tsezou A., Trachana V., Syrrou C., Papathanasiou I. The autophagic response to oxidative stress in osteoarthritic chondrocytes is deregulated. *Free Radic. Biol. Med.*, 2018, Vol. 126, pp. 122-132.
16. Manoto S.L. Editorial Commentary: is medical ozone therapy beneficial in the treatment of knee osteoarthritis? *Arthroscopy*, 2020, Vol. 36, no. 1, pp. 287-288.
17. Merhi Z., Bazzi A., Moseley-LaRue R., Moseley A.R., Smith A.H., Zhang J., Ruggiero M. Ozone therapy: overview of its potential utility in male reproduction. *Am. J. Immunol.*, 2018, Vol. 14, pp. 15-25.

Авторы:

Порядин Г.В. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Захватов А.Н. — д.м.н., доцент кафедры общей хирургии имени профессора Н.И. Алясова Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Тарасова Т.В. — д.б.н., профессор, профессор кафедры нормальной и патологической физиологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Хайдар Далила Али — соискатель кафедры нормальной и патологической физиологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Тимошкин В.О. — студент 4 курса Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Authors:

Poryadin G.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Medical Faculty, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Zakhvatov A.N., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, N. Atyasov Department of General Surgery, Medical Institute, N. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Tarasova T.V., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Medical Institute, N. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Khaydar Dalila Ali, PhD applicant, Department of Normal and Pathological Physiology, Medical Institute, N. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Timoshkin V.O., Student, Medical Institute, N. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Поступила 03.03.2020
Отправлена на доработку 14.03.2020
Принята к печати 28.03.2020

Received 03.03.2020
Revision received 14.03.2020
Accepted 28.03.2020

КОНГРУЭНТНОСТЬ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ ИММУННОЙ И НЕРВНОЙ СИСТЕМ У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА В СРАВНЕНИИ С РАССТРОЙСТВАМИ ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. В соответствии с новыми взглядами на пути и принципы коммуникации основных регуляторных систем организма – иммунной и нейроэндокринной, существует вероятность, что дезинтеграция/дезорганизация путей и структур этих систем могут лежать в основе таких нарушений, как расстройства аутистического спектра (РАС) и расстройства шизофренического спектра (РШС). Обе патологии относят к нарушениям нейроразвития, с неясной этиологией, общими факторами риска, частично перекрывающимися патофизиологическими механизмами развития. Диагностика РАС и РШС опирается на характеристику клинических симптомов/синдромов, демонстрирующих высокую гетерогенность и общность между этими расстройствами. В результате поиск путей сепарации РАС от РШС приобретает особую значимость при изучении расстройств нейроразвития у детей. Цель исследования – выделить показатели периферической активности иммунной и нейроэндокринной систем и их интеграции для использования в качестве информационных узлов конгруэнтности и фенотипической пластичности этих систем у детей с РАС в сравнении с детьми с РШС. Были определены уровни 14 показателей иммунной и нейроэндокринной систем в циркуляции у 82 детей с РАС, 9 детей с РШС и 45 детей с типичным нейроразвитием (ТРД). Для оценки интеграции иммунной и нейроэндокринной систем на периферии применяли многомерный эксплораторный анализ методом нелинейных главных компонент по алгоритму САТРСА. Результаты оценки показателей иммунной и нейроэндокринной систем у детей продемонстрировали: 1) отсутствие различий по уровням провоспалительных цитокинов между детьми с РАС и ТРД; 2) у детей с РШС – значимо высокие величины IL-6 и IFN γ и низкие – IL-1 β , TNF α и IL-10 по сравнению с детьми с РАС и ТРД; 3) уровень нейрогомонов в циркуляции у детей с РАС соответствовал таковому у ТРД (физиологическая норма), а у детей с РШС – низкие уровни адреналина и дофамина по сравнению с РАС и дофамина – с ТРД; 4) интеграция регуляторных систем была оценена с помощью анализа главных компонент: 4.1. ТРД – сильные связи внутри каждой из систем и между ними, показывают их коммуникативные способности и пластичность, характерные для физиологической нормы; 4.2. РШС – минимальное количество сильных связей внутри цитокиновой системы; 4.3. дети с РАС – формирование двух кластеров: один

Адрес для переписки:

Филиппова Юлия Юрьевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»
454001 Россия, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129.
Тел.: 8 (351) 799-71-76.
Факс: 8 (351) 742-09-25.
E-mail: julse@rambler.ru

Address for correspondence:

Filippova Yuliya Yu.
Chelyabinsk State University
454001, Russian Federation, Chelyabinsk,
Br. Kashirin str., 129.
Phone: 7 (351) 799-71-76.
Fax: 7 (351) 742-09-25.
E-mail: julse@rambler.ru

Образец цитирования:

А.Л. Бурмистрова, Ю.Ю. Филиппова «Конгруэнтность и фенотипическая пластичность иммунной и нервной систем у детей с расстройствами аутистического спектра в сравнении с расстройствами шизофренического спектра» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 703–716.
doi: 10.15789/1563-0625-CAP-1968

© Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю., 2020

For citation:

A.L. Burmistrova, Yu.Yu. Filippova "Congruency and phenotypic plasticity of immune and nervous systems in children with autism spectrum disorders compared to schizophrenia spectrum disorders", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 703–716. doi: 10.15789/1563-0625-CAP-1968

DOI: 10.15789/1563-0625-CAP-1968

(1) – по напряженности и ассортименту показателей иммунной и нейроэндокринной систем имеет полную общность с ТРД; другой (2) – презентует альтернативный характер: низкую связанность параметров регуляторных систем, аналогичную детям с РШС; 4.4. сравнительная оценка значений показателей цитокиновой и нейроэндокринной систем на периферии у детей с РАС кластеров 1 и 2 с детьми с РШС и ТРД позволила установить: у детей с РАС кластера 1 показатели не отличались от ТРД, за исключением адреналина, АКТГ, кинуренина и триптофана. У детей с РАС кластера 2 значения показателей равны показателям, характерным для детей с РШС, за исключением дофамина и триптофана.

Таким образом, нами был продемонстрирован феномен трансдиагностического кластрирования – выделения среди детей с РАС двух кластеров, один из которых имеет аналогию по уровням показателей и связей между иммунной и нейроэндокринной системами с ТРД, а другой – с детьми с РШС, что может быть использовано в качестве диагностического критерия в сегрегации двух расстройств.

Ключевые слова: цитокины, нейрогормоны, расстройства аутистического спектра, расстройства шизофренического спектра, дети, фенотипическая пластичность

CONGRUENCY AND PHENOTYPIC PLASTICITY OF IMMUNE AND NERVOUS SYSTEMS IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS COMPARED TO SCHIZOPHRENIA SPECTRUM DISORDERS

Burmistrova A.L., Filippova Yu.Yu.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. According to new views on communication ways and principles in the main regulatory systems of the body, i.e., immune and neuroendocrine, there is a risk for disintegration of pathways and structures in these systems which may underlie disorders such as autism-spectrum disorders (ASD) and schizophrenia-spectrum disorders (SSD). Both disorders are classified as neurodevelopmental disorders, with unclear etiology and partially overlapping pathophysiological developmental mechanisms. Diagnosis of ASD and SSD is based on patterns of clinical symptoms/syndromes that demonstrate high heterogeneity and similarity. Therefore, it is very important to find the ways of discerning children with ASD from those with SSD. Our aim was to identify peripheral activity indexes for immune and neuroendocrine systems, and their integration for usage as information hubs of congruency and phenotypic plasticity of these systems in children with ASD, as compared to SSD patients. The levels of 14 indexes of the immune and neuroendocrine systems in blood plasma were determined in 82 children with ASD, 9 children with SSD and 45 children with typical neurodevelopment (TD). To assess peripheral activity of the immune and neuroendocrine systems and their relationships, we applied a multivariate exploratory analysis using a method of nonlinear principal components. The following results were obtained: (1) absence of differences in proinflammatory cytokines between ASD and TD children; (2) patients with SSD have significantly higher values of IL-6 and IFN γ , and lower values of IL-1 β , TNF α and IL-10 in blood plasma compared to children with ASD and TRD; (3) the level of neurohormones in children with ASD is in accordance with physiological reference values. The children with SSD have lower levels of epinephrine and dopamine compared to ASD and TD, respectively; (4) integration degree of regulatory systems assessed by principal component analysis has shown the following: (4.1) TD children have strong correlations within each of the systems and between them, thus showing their communicative abilities and plasticity, characteristic of normal values; (4.2) In SSD children, minimal numbers of strong relations were demonstrated within the cytokine system; (4.3) The children with ASD exhibited two clusters: one of them had a complete similarity with TDC, in terms of tension and assortment of immune and neuroendocrine indices; the other one presented low coupling between the parameters of regulatory systems, similar to the children with SSD; (4.4) Analysis of peripheral indices of cytokine and neuroendocrine systems for clusters 1 and 2 in children with ASD compared to children with SSD and TD demonstrated that, in children with ASD of cluster 1, the indices did not differ from TDC, except of epinephrine, ACTH, kynurenine, and tryptophan. In the children with ASD of cluster 2, the values of the indices are equal to children with SSD, except of dopamine and tryptophan. Thus, we have

shown phenomenon of transdiagnostic clustering, i.e., allocation of two clusters among ASD children. One of them is similar to levels of indices and connections between the immune and neuroendocrine systems with TD, and another cluster is similar to SSD children. Therefore, they could be potentially useful as diagnostic criteria when discriminating the two disorders.

Keywords: cytokines, neurohormones, autism spectrum disorders, schizophrenia spectrum disorders, children, phenotypic plasticity

Введение

В настоящее время накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о тесном эволюционном родстве двух базовых систем — иммунной и нервной, которые прошли специализацию от общей мультифункциональной анцестральной клетки через процессы сегрегации и дивергенции функций между потомками клеток сестринских типов с последующим приобретением новых функций [7]. В итоге были сформированы регуляторные системы, которые определяют все сферы жизнедеятельности организма человека: метаболизм, репродукцию, рост и дифференцировку, адаптацию к изменениям внешнего окружения и внутренней среды организма, и контролируют гомеостаз в контексте конкретных событий, в том числе социальной коммуникации и социальных взаимодействий, что свидетельствует об их высокой конгруэнтности [30, 34, 54].

Высокая степень интеграции между иммунной и нервной системами определяется существованием множества клеточных и молекулярных механизмов коммуникации между ними, прежде всего с использованием общих сигнальных молекул: цитокинов, хемокинов, нейропептидов, нейротрансмиттеров, антител (в том числе аутоантител) и рецепторов к ним. Эксплуатация этих молекул позволяет периферической иммунной системе активировать функции мозга, а мозгу — исполнять иммунорегуляторную роль [8, 12].

Данные последних лет свидетельствуют, что продукция иммунорегуляторных цитокинов в мозге является чрезвычайно важным физиологическим процессом для функций мозга, опирающихся на синаптическую пластичность, таких как обучение и память [12, 18, 31, 32, 34, 37, 52].

В спокойном физиологическом состоянии лейкоциты адаптивной иммунной системы (в частности, Т-лимфоциты, аутореактивные к антигенам мозга собственного организма) из периферических компартментов поступают по путям коммуникации (которые входят в дренажные пути мозга) [29, 34, 43] к определенным территориям мозга, отделенным от паренхимы: хороидальную систему, менингеальные оболочки, периваскулярные пространства внутри паренхимы мозга, в которых реактивируются и выступают нейротекторами — «физиологической частью иммунного надзора» [21, 22]. Как отмечает

ряд авторов [22, 32, 33], существует два основных пути, по которым определенные субпопуляции иммунных клеток, обладающих специфическими молекулярными механизмами прохождения физиологических барьеров, достигают своих ниш. В менингеальных оболочках — по менингеальным сосудам крови или, альтернативно, через хороидальную систему, которая располагается внутри каждого желудочка мозга и представляет собой сосудистое сплетение, эпителиальные клетки которого продуцируют спинномозговую жидкость (СМЖ) путем фильтрации из крови [22, 33, 43]. Чтобы попасть в менингеальные оболочки иммунные клетки из сосудов крови хороидального сплетения должны пересечь эндотелиальный барьер, затем эпителиальный барьер хороидальной системы, эпителиальные клетки которой финишированы, войти в СПЖ и на последнем этапе пересечь кровь-лептоменингеальный барьер [22, 47]. Недавние исследования продемонстрировали, что через менингеальные сосуды (в том числе лимфатические) в менингеальные структуры поступают не только Т-лимфоциты, но и другие типы иммунных клеток: В-лимфоциты, гранулоциты, моноциты, макрофаги, дендритные и тучные клетки [33, 34, 36]. Более того, в отсутствие Т-лимфоцитов менингеальные миелоидные клетки приобретают провоспалительный фенотип, продуцируя IL-1 β , IL-12 и TNF α [31]. Все перечисленные анатомические ниши мозга являются функционально отдельными компартментами, в которых, в соответствии с типами сайт-специфических популяций антигенпрезентирующих клеток, поддерживаются различные типы иммунитета, в том числе протективного аутоиммунитета [4] и регуляторно-адаптивного, и обеспечивается функциональная активность самого мозга через позитивную регуляцию нейропластичности и нейрогенеза, процессов обучения, памяти и поведения, и тканевое ремоделирование [12, 18, 31, 37, 52].

Так, например, аутореактивные к антигенам нервной ткани CD4 Т-лимфоциты, проживающие в менингеальных оболочках, секретируют IL-4, который облегчает процессы обучения и памяти, предотвращая провоспалительную дифференцировку резидентных миелоидных клеток в ответ на обучение-ассоциированный стресс [19]. IFN γ , секретируемый в малых дозах аутореактивными Т-лимфоцитами, демонстрирует

различные эффекты в зависимости от фенотипа иммунной ниши: в менингеальных оболочках — выраженные положительные эффекты на нейронные дуги, ассоциированные с социальным поведением [23], а в сосудистом сплетении (choroid plexus) — принимает участие в экспрессии памяти и в нейрогенезе гиппокампа [11]. Более того, группа авторов [14] представила экспериментальные доказательства инициации цитокинами, секретируемыми Th17-лимфоцитами (участниками адаптивного ответа беременной матери на развитие мозга плода), структурных изменений в коре головного мозга и ненормального аутизм-подобного поведения у потомства.

Совершенно очевидно, что многофункциональная коммуникация двух систем должна проходить, как подчеркивает ряд авторов [12, 18, 31, 34, 52], в условиях гомеостатического эволюционного компромисса: с одной стороны, мозг нуждается в иммунологической поддержке своих жизненно важных функций при сохранении деликатных структур, а с другой — он должен осуществлять контроль за уровнем активности/повреждающей способности лейкоцитов адаптивной иммунной системы внутри мозга и лимитировать их проживание «функциональными иммунными нишами», ограниченными от паренхимы, но расположенными достаточно близко для реализации эффектов иммунной системы на функции мозга/ЦНС.

В соответствии с новыми взглядами на пути и принципы коммуникации периферической адаптивной иммунной системы и ЦНС можно предполагать, что дезинтеграция/дезорганизация путей и структур партнеров могут лежать в основе таких нейропсихиатрических нарушений, как расстройства аутистического спектра (РАС) и расстройства шизофренического спектра (РШС) [5, 13, 16]. Недавно высказано предположение, что большие нарушения психического здоровья, такие как шизофрения, депрессия и, возможно, РАС, ассоциированы с процессами дестабилизации иммунной системы, хотя до конца не ясны отношения «причина/эффект» [29, 42].

Обе патологии относят к нарушениям нейро-развития, но этиология их неизвестна, а понимание патофизиологических механизмов их развития, как подчеркивают исполнители проекта PsychENCODE Consortium [25], запаздывает по сравнению с другими областями биомедицины. Диагностика РАС и РШС опирается на поведение пациента и на характеристику клинических симптомов/синдромов, демонстрирующих высокую гетерогенность и общность между этими расстройствами, так же как и общность факторов риска, что отражается в сложности их сепарации друг от друга [8, 13, 16]. Исследования по-

казывают, что значительная пропорция детей с диагнозом «РАС» в последующем демонстрирует симптомы РШС, в том числе слуховые и зрительные галлюцинации, подобно больным с острым психозом при шизофрении, со степенью конверсии 34,8% [38]. В то же время подростки с детской атакой шизофрении (в возрасте до 13 лет) в 28% случаев презентуют коморбидность по РАС [44].

На поведенческом уровне психопатические черты — дефициты социальных взаимодействий и познавательных способностей, нарушения эмоционального процессинга при низкой реактивности к сенсомоторным стимулам и недостаточности исполнительных функций присущи обоим расстройствам. Все эти черты не закреплены константными диагностическими паттернами, а демонстрируют индивидуальную гетерогенность в своей презентации как отражение фенотипической пластичности в условиях индивидуальной жизни и, как отмечают некоторые авторы [9, 10, 17, 45, 49], нередко распределены между нормой и патологией, что еще больше затрудняет диагностику РАС и РШС.

Связь между РАС и РШС существует не только на клиническом уровне, но и на патофизиологическом и этиопатогенетическом [8, 16, 55]. Установлено, что степень наследования этих расстройств у каждого оценивается в рамках: 25-33% для РШС и 49% для РАС [41]. Сравнение результатов генетического скрининга продемонстрировало наличие их генетической общности в пределах от 15 до 25% [55]. В этом контексте количество генов-кандидатов, которые могут выступать в качестве причины, предрасположения или увеличить риск РАС/РШС, колеблется от нескольких сотен до 1000 [15, 16, 55]. В итоге, хотя генетические факторы и играют важную роль в возникновении таких нарушений, они не полностью определяются генами. Возможно, более корректно рассматривать взаимодействия «ген — окружение» в контексте различий в истории жизни индивидуума с опорой на эпигенетику.

В свете представленных данных поиск путей сепарации РАС от РШС приобретает особую значимость при изучении расстройств нейро-развития у детей. Мы предположили, что оценка показателей активности иммунной и нейроэндокринной систем на периферии и их корреляций между собой может презентовать информативные величины их коммуникации в контексте РАС и РШС. В качестве обоснования для такого предположения могут служить многочисленные данные не только о тесном родстве их функциональных характеристик: пластичность, стабильность, рекомбинация связей, регенерация, отбор информации в синапсах и т.д., но и о путях коммуникации. Месседжи, освобожденные на пери-

ферии иммунными клетками (в частности, цитокины), несут к мозгу и/или ассоциированным структурам информацию не только о состоянии гомеостаза иммунной системы в условиях изменения внутренней среды организма и внешнего окружения, но и о характере (типе) иммунного ответа на них [12, 18]. Такой ход событий позволяет мозгу контролировать и генерировать нейроэндокринные ответы, вовлекая освобождение медиаторов, таких как гормоны, нейропептиды и нейротрансмиттеры, которые в сетевом взаимодействии с ауторегуляторными иммунными механизмами способны оказывать коллегальное влияние на иммунную реактивность [12, 18, 40, 52].

Цель исследования – выделить показатели периферической активности иммунной и нейроэндокринной систем и их интеграции для использования в качестве информационных узлов конгруэнтности и фенотипической пластичности этих систем у детей с расстройствами аутистического спектра в сравнении с детьми с расстройствами шизофренического спектра.

Материалы и методы

Обследовано 82 ребенка (64 мальчика (78,0%) и 18 девочек (22,0%), средний возраст $6,4 \pm 0,3$ года) с РАС, проходивших немедикаментозную реабилитацию в социально-реабилитационном центре «Здоровье» (г. Челябинск). Все дети с РАС имели диагнозы в соответствии с МКБ-10: детский аутизм (F84.0), атипичный аутизм (F84.1) и задержка психоречевого развития с аутистически подобным поведением (F83.1). В качестве контрольной группы в исследование включено 9 детей с РШС (5 мальчиков (55,6%) и 4 девочки (44,4%), средний возраст $14,7 \pm 1,2$ года), находящихся на диспансерном учете в Областной клинической специализированной психоневрологической больнице № 1 г. Челябинска с диагнозами: сенестопатическая шизофрения (F20.8) и шизоаффективное расстройство, маниакальный тип (F25.0). Во вторую контрольную группу вошли 45 типично развивающихся детей (ТРД, 32 мальчика (71,7%) и 13 девочек (28,9%)) дошкольного и младшего школьного возраста (средний возраст $8,9 \pm 0,3$ года). В исследование не были включены дети в периоды болезни и ранней ремиссии после острых респираторно-вирусных заболеваний. У всех родителей получено информированное согласие, разрешающее проведение лабораторного исследования и использование его результатов в научной работе. Работа одобрена этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 1 от 16.05.2016 г.).

У всех детей установлены уровни 14 показателей иммунной и нейроэндокринной систем в

циркуляции. Концентрацию цитокинов: интерлейкина-6 (IL-6), IL-1 β , IL-10, интерферона-гамма – IFN γ , фактора некроза опухолей-альфа TNF α (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск); нейромодуляторов: окситоцина (Peninsula Laboratories International, США), дофамина, адреналина, норадреналина (IBL International, Германия), кортизола (ООО «Хема», Россия), адренокортикотропного гормона – АКТГ (Biomerica, Германия), серотонина (IBL International, Германия) и метаболитов: триптофана и кинуренина (Immundiagnostik AG, Германия) определяли в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе Multiscan EX (LabSystems, Финляндия).

В ходе статистической обработки данных использовали порядковые статистики и критерии: для оценки центральной тенденции – расчет среднего значения и ошибки среднего ($M \pm m$), для оценки значимости межгрупповых различий – критерий Стьюдента. Во всех случаях различия и зависимости считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Для оценки интеграции иммунной и нейроэндокринной систем у детей с РАС был применен многомерный эксплораторный анализ методом нелинейных главных компонент по алгоритму САТРСА. Для приведения значений к нормальному распределению данные обрабатывались как количественные показатели с последующим ранжированием. Для поиска значимых различий между группами РАС и РШС/ТРД по результатам анализа нелинейных главных компонент для каждого ребенка, включенного в исследование, были рассчитаны индивидуальные величины каждой главной компоненты (ГК) и проведен однофакторный дисперсионный анализ. Все расчеты и графические построения выполнены в пакетах SPSS for Windows (v. 18.0., SPSS Inc.) и KyPlot (v. 5.0 beta 15; Yochioka, 2002).

Результаты

Сравнительный анализ периферических уровней некоторых показателей иммунной и нейроэндокринной систем у детей с РАС, РШС и ТРД

Результаты оценки уровней 14 показателей иммунной и нейроэндокринной систем в плазме крови обследованных детей представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, у детей с РАС уровень всех исследованных провоспалительных цитокинов в плазме крови не имеет статистически значимых различий, а концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 значимо снижена по сравнению с ТРД. У детей с РШС в циркуляции обнаружены высокие значения цитокинов: IL-6 и IFN γ и низкие – IL-1 β , TNF α и IL-10 по сравнению с группами РАС и ТРД (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ И НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМ У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА В СРАВНЕНИИ С ДЕТЬМИ С РАССТРОЙСТВАМИ ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА (M±m)
TABLE 1. INDICATORS OF THE IMMUNE AND NEUROENDOCRINE SYSTEMS IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS COMPARED TO CHILDREN WITH SCHIZOPHRENIA SPECTRUM DISORDERS (M±m)

Показатель Indicator	ТРД TDC (n = 45)	Дети с РАС Children with ASD (n = 82)	Дети с РШС Children with SSD (n = 9)
Возраст Age	8,90±0,34	6,37±0,30 p ₂₋₁ < 0,001	13,78±1,05 p ₃₋₁ < 0,001 p ₃₋₂ < 0,001
Цитокины / Cytokines			
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	2,17±0,25	2,93±0,27	5,51±0,74 p ₃₋₁ < 0,001 p ₃₋₂ = 0,003
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/ml	3,40±0,24	2,90±0,14	1,96±0,19 p ₃₋₁ = 0,008 p ₃₋₂ = 0,023
TNFα, пг/мл TNFα, pg/ml	2,84±0,25	2,42±0,13	1,45±0,16 p ₃₋₁ = 0,016 p ₃₋₂ = 0,011
IFNγ, пг/мл IFNγ, pg/ml	11,31±0,50	11,96±0,35	15,09±1,31 p ₃₋₁ = 0,002 p ₃₋₂ = 0,006
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	12,38±1,95	8,64±0,75 p ₂₋₁ = 0,035	6,48±0,70 p ₃₋₁ < 0,001 p ₃₋₂ = 0,035
Нейрогормоны / Neurohormones			
Окситоцин, нг/мл Oxytocin, ng/ml	0,16±0,02	0,14±0,01	0,10±0,02
Дофамин, пг/мл Dopamine, pg/ml	147,20±13,93	135,80±6,81	66,79±4,26 p ₃₋₁ = 0,005 p ₃₋₂ = 0,001
Адреналин, пг/мл Epinephrine, pg/ml	4,12±0,39	4,60±0,38	2,28±0,37 p ₃₋₂ = 0,035
Норадреналин, пг/мл Norepinephrine, pg/ml	23,50±4,12	18,00±1,75	24,69±6,76
Кортизол, нмоль/л Cortisol, nmol/l	663,50±74,16	619,40±42,97	501,80±50,12
АКТГ, пг/мл ACTH, pg/ml	17,76±1,64	20,96±1,99	15,45±5,28
Серотонин, нг/мл Serotonin, ng/ml	18,83±1,68	20,10±1,34	19,65±4,30
Метаболиты / Metabolites			
Триптофан, мкмоль/л Tryptophan, μmol/l	162,1±12,64	111,6±7,05 p ₂₋₁ < 0,001	48,77±11,06 p ₃₋₁ = 0,001 p ₃₋₂ = 0,01
Кинуренин, мкмоль/л Kynurenine, μmol/l	1,38±0,19	2,06±0,16 p ₂₋₁ = 0,025	3,15±0,80 p ₃₋₁ = 0,003 p ₃₋₂ = 0,050

Примечание. ТРД – типично развивающиеся дети; РАС – расстройства аутистического спектра; РШС – расстройства шизофренического спектра. p₂₋₁ – значимые различия между ТРД и детьми с РАС (p ≤ 0,05); p₃₋₁ – значимые различия между ТРД и детьми с РШС (p ≤ 0,05); p₃₋₂ – значимые различия между детьми с РАС и РШС (p ≤ 0,05).

Note. TDC, typically developing children; ASD, autism spectrum disorder; SSD, schizophrenia spectrum disorders. p₂₋₁, significant differences between TDC and children with ASD (p ≤ 0.05); p₃₋₁, significant differences between TDC and children with SSD (p ≤ 0.05); p₃₋₂, significant differences between children with ASD and SSD (p ≤ 0.05).

Концентрации в плазме базовых нейромодуляторов, отвечающих за социальную адаптацию (окситоцина, дофамина, адреналина, норадреналина, кортизола, АКТГ), у детей с РАС соответствуют физиологической норме. Для детей с РШС характерны значимо низкие уровни дофамина и адреналина по сравнению с аналогичными показателями групп детей с РАС и дофамина по сравнению с ТРД (табл. 1).

Уровень серотонина не отличается среди детей трех исследуемых групп, но значимые различия выявлены для ключевых метаболитов его синтеза/распада: для РАС характерны промежуточные значения основного прекурсора серотонина – триптофана и промежуточного продукта распада триптофана – кинуренина, по сравнению с контрольными группами. Так, концентрация триптофана в плазме крови детей с РАС значимо ниже, чем у ТРД, но выше аналогичного показателя детей с РШС. Наоборот, системные уровни

кинурина при РАС значимо высокие по сравнению с ТРД, но низкие по сравнению с детьми с РШС (табл. 1).

Поиск узлов конгруэнтности и фенотипической пластичности иммунной и нейроэндокринной систем у детей с расстройствами аутистического спектра

Чтобы оценить изменение не только отдельных показателей, но и особенности сетевого взаимодействия иммунной и нейроэндокринной регуляторных систем в группах детей с РАС, РШС и ТРД, нами применен многомерный эксплораторный анализ методом нелинейных главных компонент (табл. 2, рис. 1).

В результате анализа получены четыре паттерна взаимосвязанных показателей (главных компоненты, ГК). ГК 1 объясняет 29% общей дисперсии показателей и отражает высокий уровень интеграции иммунной и нейроэндокринной систем на периферии. В нее входят показате-

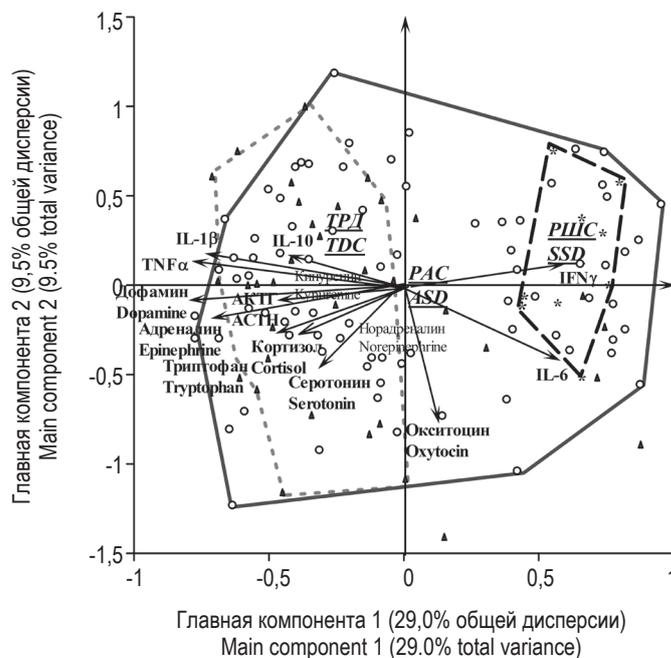


Рисунок 1. Ординационная диаграмма взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем у детей с РАС, РШС и ТРД по результатам метода нелинейных главных компонент

Примечание. Рисунок построен на основе корреляционных взаимосвязей всех исследуемых показателей, вошедших в главную компоненту (ГК) 1 (ось X) и ГК 2 (ось Y). Показатели, внесшие наибольший вклад в ГК1 и ГК2, показаны векторами. Чем больше длина вектора, тем выше вклад данного показателя в ГК. Расположение каждого ребенка в пространстве двух ГК для детей с РАС показано кругами, для детей с РШС – звездочками, для ТРД – треугольниками. Полигонами выделены области, в которые входят дети, относящиеся к группе РАС – черная непрерывная линия, РШС – черная пунктирная линия и ТРД – линия, нарисованная точками серого цвета.

Figure 1. Ordination diagram of the interaction of the immune and neuroendocrine systems in children with ASD, SSD and TRD according to the results of the method of nonlinear main components

Note. The figure is based on the correlation relationships of all the studied indicators included in the main component (MC) 1 (X axis) and MC 2 (Y axis). The indicators that made the greatest contribution to MC 1 and MC 2 are shown by vectors. The greater the length of the vector, the higher the contribution of this indicator to the MC. The location of each child in the space of two MCs for children with ASD is shown in circles; for children with SSD, asterisks; for TDC, triangles. Polygons highlight areas that include children belonging to the ASD group, the black continuous line; SSD, the black dashed line, and TDC, the gray dotted line.

ТАБЛИЦА 2. МАТРИЦА ФАКТОРНЫХ НАГРУЗОК ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОЙ И НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМ ДЕТЕЙ С РАС, РШС И ТРД, ПОЛУЧЕННАЯ В ХОДЕ НЕЛИНЕЙНОГО АНАЛИЗА ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ

TABLE 2. MATRIX OF FACTOR LOADS OF INDICATORS OF IMMUNE AND NEUROENDOCRINE SYSTEMS OF CHILDREN WITH ASD, SSD AND TDC, OBTAINED DURING NONLINEAR MAIN COMPONENT ANALYSIS

Показатель Indicator	Величина показателя (весовая нагрузка) Value of indicator (weight load)			
	Главная компонента 1 Main component 1	Главная компонента 2 Main component 2	Главная компонента 3 Main component 3	Главная компонента 4 Main component 4
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	0,580	-0,413	-0,108	0,262
IL-1β, пг/мл IL-1 β , pg/ml	-0,734	0,204	0,007	0,275
TNFα, пг/мл TNF α , pg/ml	-0,782	0,150	-0,043	0,354
IFNγ, пг/мл IFN γ , pg/ml	0,613	0,122	-0,012	0,413
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	-0,421	0,180	-0,297	0,172
Окситоцин, нг/мл Oxytocin, ng/ml	0,124	-0,759	-0,259	-0,039
Дофамин, пг/мл Dopamine, pg/ml	-0,795	-0,068	0,178	-0,055
Адреналин, пг/мл Epinephrine, pg/ml	-0,708	-0,179	0,303	0,045
Норадреналин, пг/мл Norepinephrine, pg/ml	-0,045	-0,249	0,776	0,327
Кортизол, нмоль/л Cortisol, nmol/l	-0,390	-0,287	-0,064	-0,059
АКТГ, пг/мл ACTH, pg/ml	-0,556	-0,026	-0,181	-0,301
Серотонин, нг/мл Serotonin, ng/ml	-0,299	-0,450	-0,077	0,379
Триптофан, мкмоль/л Tryptophan, μ mol/l	-0,497	-0,303	-0,079	-0,389
Кинуренин, мкмоль/л Kynurenine, μ mol/l	-0,278	0,006	-0,545	0,422
Доля объясненной дисперсии, % Fraction of total dispersion, %	29,0	9,5	8,9	8,2

Примечание. Величина показателя (весовая нагрузка) показывает, с какой силой и знаком показатель участвует в главной компоненте: наиболее сильные корреляционные связи образуют показатели с высокой нагрузкой (значения выше 0,7); показатели со значениями меньше 0,4 не вносят вклад в главную компоненту (очень слабые корреляционные связи). Доля объясненной дисперсии отражает, какой процент разброса значений всех показателей (из 100%) объясняет конкретная главная компонента. Жирным шрифтом выделены доли объясненной дисперсии, а также весовые нагрузки показателей высокой (коэффициент корреляции, r выше 0,7) и средней (коэффициент корреляции, r от 0,4 до 0,7) значимости.

Note. The value of the indicator (weight load) shows with what strength and sign the indicator participates in the main component: the strongest correlation links are formed by indicators with a high load (values above 0.7); indicators with values less than 0.4 do not contribute to the main component (very weak correlation relationships). The share of the explained variance reflects what percentage of the scatter of the values of all indicators (out of 100%) the specific main component explains. The bold type indicates the shares of the explained variance, as well as the weight loads of indicators of high (correlation coefficient, r above 0.7) and average (correlation coefficient, r from 0.4 to 0.7) significance.

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ И НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМ В ПОДГРУППАХ ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА (M±m)

TABLE 2. INDICATORS OF IMMUNE AND NEUROENDOKRIN SYSTEMS IN SUBGROUPS OF CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS (M±m)

Показатель Indicator	ТРД TDC (n = 45)	Дети с РАС подгруппа 1 Children with ASD subgroup 1 (n = 55)	Дети с РШС Children with SSD (n = 9)	Дети с РАС подгруппа 2 Children with ASD subgroup 2 (n = 27)
Возраст Age	8,90±0,34	6,35±2,40 p ₂₋₁ < 0,001	13,78±1,05 p ₃₋₁ < 0,001 p ₃₋₂ < 0,001	6,41±3,32 p ₄₋₁ < 0,001 p ₄₋₃ < 0,001
Цитокины / Cytokines				
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	2,17±0,25	2,22±0,27	5,51±0,74 p ₃₋₁ < 0,001 p ₃₋₂ = 0,002	4,32±0,49 p ₄₋₁ < 0,001 p ₄₋₂ = 0,001
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/ml	3,40±0,24	3,32±0,15	1,96±0,19 p ₃₋₁ = 0,008 p ₃₋₂ < 0,001	1,97±0,09 p ₄₋₁ < 0,001 p ₄₋₂ < 0,001
TNFα, пг/мл TNFα, pg/ml	2,84±0,25	2,85±0,13	1,45±0,16 p ₃₋₁ = 0,016 p ₃₋₂ < 0,001	1,53±0,12 p ₄₋₁ < 0,001 p ₄₋₂ < 0,001
IFNγ, пг/мл IFNγ, pg/ml	11,31±0,50	10,89±0,34	15,09±1,31 p ₃₋₁ = 0,002 p ₃₋₂ = 0,012	14,04±0,51 p ₄₋₁ < 0,001 p ₄₋₂ < 0,001
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	12,38±1,95	9,27±0,83	6,48±0,70 p ₃₋₁ < 0,001 p ₃₋₂ = 0,014	7,04±1,22 p ₄₋₁ = 0,027
Нейрогормоны / Neurohormones				
Окситоцин, нг/мл Oxytocin, ng/ml	0,16±0,02	0,13±0,01	0,10±0,02	0,16±0,02 p ₄₋₃ = 0,003
Дофамин, пг/мл Dopamine, pg/ml	147,20±13,93	157,50±6,14	66,79±4,26 p ₃₋₁ = 0,005 p ₃₋₂ < 0,001	86,18±6,31 p ₄₋₁ < 0,001 p ₄₋₂ < 0,001 p ₄₋₃ = 0,026
Адреналин, пг/мл Epinephrine, pg/ml	4,12±0,39	5,10±0,41 p ₂₋₁ = 0,028	2,28±0,37 p ₃₋₁ = 0,009 p ₃₋₂ < 0,001	3,06±0,42 p ₄₋₂ < 0,001
Норадреналин, пг/мл Norepinephrine, pg/ml	23,50±4,12	14,67±1,61	24,69±6,76	20,88±3,09
Кортизол, нмоль/л Cortisol, nmol/l	663,50±74,16	702,50±47,67	501,80±50,12 p ₃₋₂ = 0,006	431,1±65,4 p ₄₋₁ = 0,022 p ₄₋₂ = 0,001
АКТГ, пг/мл ACTH, pg/ml	17,76±1,64	23,45±2,03 p ₂₋₁ = 0,03	15,45±5,28	15,50±3,86
Серотонин, нг/мл Serotonin, ng/ml	18,83±1,68	22,16±1,65	19,65±4,30	15,18±1,69 p ₄₋₂ = 0,004
Метаболиты / Metabolites				
Триптофан, мкмоль/л Tryptophan, μmol/l	162,10±12,64	121,00±8,18 p ₂₋₁ = 0,013	48,77±11,06 p ₃₋₁ = 0,001 p ₃₋₂ < 0,001	86,71±10,38 p ₄₋₁ < 0,001 p ₄₋₂ = 0,014 p ₄₋₃ = 0,024
Кинуренин, мкмоль/л Kynurenine, μmol/l	1,38±0,19	2,18±0,14 p ₂₋₁ = 0,010	3,15±0,80 p ₃₋₁ = 0,003	1,82±0,35

Примечание. См. примечание к таблице 1. p₂₋₁ – значимые различия между ТРД и детьми с РАС подгруппа 1 (p ≤ 0,05); p₃₋₁ – значимые различия между ТРД и детьми с РШС (p ≤ 0,05); p₃₋₂ – значимые различия между детьми с РШС и детьми с РАС подгруппы 1 (p ≤ 0,05). p₄₋₁ – значимые различия между ТРД и детьми с РАС подгруппы 2 (p ≤ 0,05); p₄₋₂ – значимые различия между детьми с РАС подгрупп 1 и 2 (p ≤ 0,05); p₄₋₃ – значимые различия между детьми с РШС и детьми с РАС подгруппы 2 (p ≤ 0,05).

Note. As for Table 1. p₂₋₁, significant differences between TDC and children with ASD subgroup 1 (p ≤ 0.05); p₃₋₁, significant differences between TDC and children with SSD (p ≤ 0.05); p₃₋₂, significant differences between children with SSD and children with ASD subgroup 1 (p ≤ 0.05); p₄₋₁, significant differences between TDC and children with ASD subgroup 2 (p ≤ 0.05); p₄₋₂, significant differences between children with ASD subgroups 1 and 2 (p ≤ 0.05); p₄₋₃, significant differences between children with SSD and children with ASD subgroup 2 (p ≤ 0.05).

тели всех исследуемых цитокинов, образующие корреляционные связи высокой и средней силы внутри системы и межсистемные связи с нейромедиаторами: дофамином, адреналином, АКТГ, а также прекурсором серотонина – триптофаном (табл. 2). Остальные три ГК (ГК2, ГК3, ГК4) объясняют менее 10% общей дисперсии каждая и включают по два-три показателя изученных систем, которые, вероятно, могут определять не отдельные процессы, а их части, что создает трудности для их интерпретации (табл. 2).

Однофакторный дисперсионный анализ каждой ГК позволил обнаружить, что группы детей с РАС, РШС и ТРД значительно отличаются по степени выраженности ГК1. Для визуализации этих различий нами построена ординационная диаграмма (рис. 1).

Как видно из рисунка 1, взаимосвязанные показатели, вошедшие в ГК 1, четко разделены на два кластера, противопоставленные друг другу. Первый кластер (отрицательные корреляции, область отрицательных значений оси X) включает в себя показатели IL-1 β , TNF α , IL-10, нейромедиаторов и триптофана. Второй кластер (положительные корреляции, область положительных значений оси X) образуют только два цитокина: IL-6 и IFN γ . Эти кластеры демонстрируют особенности нейроиммунных взаимодействий, характерные для ТРД и детей с РШС:

– кластер 1 – ТРД (область отрицательных значений оси X) – сильные внутри- и межсистемные связи между показателями всех нейромедиаторов и цитокинов, возможно, отражающие интеграцию иммунной и нейроэндокринной систем;

– кластер 2 – дети с РШС (область положительных значений оси X) – демонстрирует наличие сильных связей только между двумя показателями системы цитокинов – IL-6 и IFN γ – и полное отсутствие корреляций между показателями иммунной и нервной систем (рис. 1).

Группа детей с РАС обладает выраженной фенотипической гетерогенностью, в результате, в зависимости от показателей и связей, характеризующих уровни активности иммунной и нейроэндокринной систем, презентует 2 кластера: один (подгруппа 1), расположенный в области отрицательных значений, является перекрывающимся с ТРД, другой (подгруппа 2) – в области положительных значений, составляет общий кластер с показателями детей с РШС (рис. 1).

Выявление особенностей показателей иммунной и нейроэндокринной систем в подгруппах детей с РАС

Для подтверждения фенотипической гетерогенности группы детей с РАС мы разделили ее на две подгруппы в соответствии с кластеризацией, полученной в анализе главных компонент, и оце-

нили уровни цитокинов и нейрогормонов в плазме крови детей этих подгрупп (табл. 3).

Результаты, представленные в таблице 3, подтвердили наши предположения:

1. Дети с РАС (подгруппа 1) – сравнение с ТРД. Показатели цитокинов и нейрогормонов в плазме крови не отличаются от аналогичных показателей ТРД, за исключением уровней адреналина, АКТГ, кинуренина, которые значимо повышены, и триптофана, который снижен у детей с РАС (табл. 3).

2. Дети с РАС (подгруппа 2) – сравнение с РАС (подгруппа 1). Показатели цитокинов IL-1 β и TNF α существенно ниже, а IL-6 и IFN γ – выше по сравнению с детьми с РАС (подгруппа 1). Показатели нейрогормонов дофамина, адреналина, кортизола, серотонина, а также триптофана снижены по отношению к подгруппе 1 (РАС) (табл. 3).

3. Дети с РШС – сравнение с показателями детей с РАС 1 и 2 подгрупп. РШС – РАС (подгруппа 1) – практически все показатели несут отличия. У детей с РШС: цитокины – значимо высокие показатели IL-6 и IFN γ на фоне низких IL-1 β и TNF α и IL-10; нейрогормоны – низкие: дофамин, адреналин, кортизол, а также триптофан. РШС – РАС (подгруппа 2) – равнозначность всех показателей за исключением двух: дофамин и триптофан выше в подгруппе 2 (РАС) (табл. 3).

Обсуждение

Несмотря на большое внимание к РАС и РШС, этиология этих патологий до конца неясна и, вероятно, включает в себя сложные взаимодействия между генетическими, эпигенетическими и экологическими факторами. В настоящее время высказано предположение, что иммунная дисфункция может способствовать прогрессии РАС и РШС, однако механизмы такого воздействия остаются неизученными [29, 42]. Поэтому нами была предпринята попытка комплексной оценки показателей основных регуляторных систем – иммунной и нейроэндокринной у детей с РАС и РШС.

Полученные нами данные свидетельствуют об отсутствии у детей с РАС провоспалительного потенциала цитокинов на периферии. Такие же результаты были получены рядом исследователей [39, 46], которые не обнаружили значительных различий в цитокиновом профиле между детьми с РАС и их типично развивающимися сибсами. Другая группа авторов [51] сообщила о повышении в циркуляции только уровня IL-8 по сравнению с детьми контрольной группы. В настоящее время вопрос о провоспалительном статусе детей с РАС находится в стадии пролонгированной дискуссии, так как часть исследователей

приводит результаты о расширенном представительстве провоспалительных цитокинов на периферии [6, 27].

Для детей с РШС характерна особая траектория распределения уровней цитокинов, в частности высокие уровни IL-6 и IFN γ и низкие – IL-1 β , TNF α и IL-10 по сравнению с группами РАС и ТРД. Известно, что IL-6 способен снижать воспалительный ответ за счет уменьшения продукции IL-1 β и TNF α и даже индуцировать анти-воспалительные эффекты в условиях, когда его активация проходит без сопутствующей активации IL-1 β и TNF α . Более того, эти эндогенно продуцируемые цитокины, похоже, играют оппозиционную роль в обучении и памяти: IL-1 β поддерживает, а IL-6 ингибирует эти процессы [18, 26, 35]. Что касается высоких уровней IFN γ в плазме крови детей с РШС, то они способны оказать неблагоприятные последствия в ЦНС, в том числе выраженные воспалительные изменения, вплоть до дегенеративных процессов при переключении иммунных ответов на Th1-клеточный тип. Кроме того, ЦНС-аутореактивные Т-лимфоциты могут активироваться в периферических иммунных компартментах нейротрофические вирусами, которые поражают системные компартменты, что индуцирует провоспалительный Th1-ответ. Активировать аутореактивные Т-лимфоциты могут «чужеродные» мимотопы ЦНС-аутоантигенов (с большой долей вероятности поставляемые микробными сообществами кишечника). Такие активированные лимфоциты, направляясь в ЦНС, могут использовать aberrантные или классические пути и вызывать аутоиммунные нарушения [28, 29, 34, 52].

Интеграция иммунной и нервной систем у детей с РАС, РШС и ТРД была оценена с помощью эксплораторного анализа методом нелинейных главных компонент, который позволяет одновременно изучать изменение набора характеристик, выявляя комплексные взаимосвязи различных показателей, структуру и характер взаимосвязей между ними, что способствует лучшему пониманию патофизиологии сложных заболеваний [3]. Нами была продемонстрирована высокая гетерогенность группы детей с РАС – выделение среди детей с РАС новых подгрупп, родственных по показателям и связям двух регуляторных систем: одна составляла общий кластер с ТРД (РАС (55 детей) – ТРД), другая – с РШС (РАС (27 детей) – РШС).

Общность показателей и связей иммунной/нейроэндокринной систем РАС и ТРД и РАС и РШС позволяет говорить о конгруэнтности систем. Более того, можно предположить, что дети с РАС в составе ТРД презентуют не столько поломку/нарушения этих регуляторных систем, сколько

ко дисфункцию фенотипической пластичности, определяемой генотипом, историей жизни, полом, возрастом, метаболизмом и, в свете современных данных, огромной интегральной составляющей нашего макроорганизма – микробными симбионтами [2, 50]. Ранее нами было показано, что уровни социальной коммуникации/поведения у детей с РАС ассоциированы с реконструкцией микробного сообщества тонкого кишечника [1]. Именно фенотипическая пластичность является основой адаптивной пластичности, обеспечивающей развитие новых сетей взаимодействия/коммуникации регуляторных систем в условиях окружения для соответствия им [20].

В условиях техногенной революции, экологических катастроф, дезорганизации социальных связей, в том числе роста процессов урбанизации, миграции, изменений социально-экономического статуса эмигрантов [48], деструкций микробных сообществ окружающей среды и организма человека (его симбионтов) [24], возрастания агрессивности на фоне роста виртуальных социальных отношений/взаимосвязей [53], вероятно, происходит, как мы предполагаем, дезинтеграция коммуникации иммунной и нейроэндокринной систем как форма адаптации к новым условиям окружения, что находит свое отражение в росте РАС на фоне отсутствия роста кривой заболеваемости РШС [34].

Однако все отмеченное нами не исключает, что некоторые формы РАС, по существу, относятся к нарушениям, возможно, как группа детей с РАС, близкая по большинству параметров к РШС (как показано нами) – шизотипический фенотип.

Сегрегация дисфункции/поражений иммунной/нейроэндокринной систем при нейропсихиатрических нарушениях, прежде всего РАС и РШС, требует новых мультифункциональных комплексных подходов к оценке индивидуума на всех уровнях: организм, системы, клетки, молекулы, гены, через траекторию развития организма – пре-, постнатальный, подростковый, репродуктивный этапы, этап старения, и историю его жизни. Продемонстрированный нами феномен трансдиагностического кластрирования – выделения среди детей с РАС двух кластеров, один из которых имеет аналогию по уровням показателей и связей между иммунной и нейроэндокринной системами с ТРД, а другой – с детьми с РШС – может быть использован в качестве диагностического критерия в сегрегации двух расстройств.

Список литературы / References

1. Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю., Тимофеева А.В. Микробный консорциум и окситоцин в социальном поведении детей с расстройствами аутистического спектра // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2018. № 4. С. 62-67. [Burmistrova A.L., Filippova Yu.Yu., Timofeeva A.V. Microbial consortium and oxytocin in the social behavior of children with autism spectrum disorders. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology*, 2018, Vol. 4, pp. 62-67. (In Russ.)]
2. Бухарин О.В. Инфекционная симбиология // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2015. № 4. С. 4-9. [Bukharin O.V. Infectious symbiology. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 4, pp. 4-9. (In Russ.)]
3. Кузьмина Е.Г., Зацаренко С.В. Многофакторное моделирование иммунного статуса в выявлении вторичных иммунодефицитных состояний и аллергии // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 275-284. [Kuzmina E.G., Zatsarenko S.V. Multivariate modelling of the immune status in detection of secondary immunodeficiency and the allergy. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 275-284. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-275-284.
4. Никифорова Т.А., Песков С.А., Доронина О.Б. Анализ современного состояния клинико-экспериментальных данных о взаимодействии нервной и иммунной систем // Бюллетень сибирской медицины, 2014. Т. 13, № 6. С. 72-80. [Nikiforova T.A., Peskov S.A., Doronina O.B. Analysis of the current state of clinical and experimental data on the interaction of the nervous and immune systems. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2014, Vol. 13, no. 6, pp. 72-80. (In Russ.)]
5. Семина И.И., Мухарямова Л.М., Сабиров И.С. Валеева Е.В., Сафиуллина Л.Р., Никитин Д.О. Современное состояние проблемы расстройств аутистического спектра – некоторые медико-биологические и социально-гуманитарные аспекты // Казанский медицинский журнал, 2019. Т. 100, № 6. С. 918-929. [Semina I.I., Mukharyamova L.M., Sabirov I.S., Valeeva E.V., Safiullina L.R., Nikitin D.O. The current state of the problem of autism spectrum disorders – some biomedical and socio-humanitarian aspects. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2019, Vol. 100, no. 6, pp. 918-929. (In Russ.)]
6. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav. Immun.*, 2011, Vol. 25, no. 1, pp. 40-45.
7. Arendt D. The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies. *Nat. Rev. Genet.*, 2008, Vol. 9, no. 11, pp. 868-882.
8. Barlati S., Deste G., Ariu C., Vita A. Autism spectrum disorder and schizophrenia: do they overlap? *Int. J. Emerg. Ment. Health*, Vol. 18, no. 1, pp. 760-763.
9. Baron-Cohen S. Editorial perspective: neurodiversity – a revolutionary concept for autism and psychiatry. *J. Child. Psychol. Psychiatry*, 2017, Vol. 58, no. 6, pp. 744-747.
10. Baron-Cohen S. Two new theories of autism: hyper-systemising and assortative mating. *Arch. Dis. Child.*, 2006, Vol. 91, no. 1, pp. 2-5.
11. Baruch K., Deczkowska A., David E., Castellano J.M., Miller O., Kertser A., Berkutzki T., Barnett-Itzhaki Z., Bezalet D., Wyss-Coray T., Amit I., Schwartz M. Aging. Aging-induced type I interferon response at the choroid plexus negatively affects brain function. *Science*, 2014, Vol. 346, pp. 89-93.
12. Besedovsky H.O. The immune system as a sensorial system that can modulate brain functions and reset homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2019, Vol. 1437, no. 1, pp. 5-14.
13. Canitano R., Pallagrosi M. Autism spectrum disorders and schizophrenia spectrum disorders: excitation/inhibition imbalance and developmental trajectories. *Front. Psychiatry*, 2017, Vol. 8, 69. doi:10.3389/fpsy.2017.00069.
14. Choi G.B., Yim Y.S., Wong H., Kim S., Kim H., Kim S.V., Hoeffler C.A., Littman D.R., Huh J.R. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 2016, Vol. 351, pp. 933-939.
15. Craddock N., Owen M.J. The Kraepelinian dichotomy – going, going... but still not gone. *Br. J. Psychiatry*, 2010, Vol. 196, no. 2, pp. 92-95.
16. de Lacy N., King B.H. Revisiting the relationship between autism and schizophrenia: toward an integrated neurobiology. *Annu. Rev. Clin. Psychol.*, 2013, Vol. 9, pp. 555-587.
17. del Giudice M., Klimczuk A.C.E., Traficante D.M., Maestripieri D. Autistic-like and schizotypal traits in a life history perspective: diametrical associations with impulsivity, sensation seeking, and sociosexual behavior. *Evol. Hum. Behav.*, 2014, Vol. 35, no. 5, pp. 415-424.
18. del Rey A., Besedovsky H.O. Immune-neuro-endocrine reflexes, circuits, and networks: physiologic and evolutionary implications. *Front. Horm. Res.*, 2017, Vol. 48, pp. 1-18.
19. Derecki N.C., Cardani-Boulton A.N., Yang C.H., Quinnes K.M., Crihfield A., Lynch K.R., Kipnis J. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J. Exp. Med.*, 2010, Vol. 207, no. 5, pp. 1067-1080.
20. Draghi J.A., Whitlock M.C. Phenotypic plasticity facilitates mutational variance, genetic variance, and evolvability along the major axis of environmental variation. *Evolution*, 2012, Vol. 66, no. 9, pp. 2891-2902.

21. Engelhardt B. T cell migration into the central nervous system during health and disease: Different molecular keys allow access to different central nervous system compartments. *Clin. Exp. Neuroimmunol.*, 2010, Vol. 1, pp. 79-93.
22. Engelhardt B., Ransohoff R.M. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol.*, 2012, Vol. 33, no. 12, pp. 579-589.
23. Filiano A.J., Xu Y., Tustison N.J., Marsh R.L., Baker W., Smirnov I., Overall C.C., Gadani S.P., Turner S.D., Weng Z., Peerzade S.N., Chen H., Lee K.S., Scott M.M., Beenhakker M.P., Litvak V., Kipnis J. Unexpected role of interferon- γ in regulating neuronal connectivity and social behavior. *Nature*, 2016, Vol. 535, no. 7612, pp. 425-429.
24. Flandroy L., Pouthahidis T., Berg G., Clarke G., Dao M.C., Decaestecker E., Furman E., Haahtela T., Massart S., Plovier H., Sanz Y., Rook G. The impact of human activities and lifestyles on the interlinked microbiota and health of humans and of ecosystems. *Sci. Total Environ.*, 2018, Vol. 627, pp. 1018-1038.
25. Gandal M.J., Zhang P., Hadjimichael E., Walker R.L., Chen C., Liu S., Won H., van Bakel H., Varghese M., Wang Y., Shieh A.W., Haney J., Parhami S., Belmont J., Kim M., Losada P.M., Khan Z., Mleczko J., Xia Y., Dai R., Wang D., Yang Y.T., Xu M., Fish K., Hof P.R., Warrell J., Fitzgerald D., White K., Jaffe A.E., PsychENCODE Consortium, Peters M.A., Gerstein M., Liu C., Iakoucheva L.M., Pinto D., Geschwind D.H., Transcriptome-wide isoform-level dysregulation in ASD, schizophrenia, and bipolar disorder. *Science*, 2018, Vol. 362, eaat8127. doi:10.1126/science.aat8127.
26. García-Bueno B., Caso J.R., Leza J.C. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2008, Vol. 32, no. 6, pp. 1136-1151.
27. Gomez-Fernandez A., de la Torre-Aguilar M.J., Gil-Campos M., Flores-Rojas K., Cruz-Rico M.D., Martin-Borreguero P., Perez-Navero J.L. Children with autism spectrum disorder with regression exhibit a different profile in plasma cytokines and adhesion molecules compared to children without such regression. *Front. Pediatr.*, 2018, Vol. 6, 264. doi: 10.3389/fped.2018.00264.
28. Kawakami N., Bartholomäus I., Pesic M., Mues M. An autoimmunity odyssey: how autoreactive T cells infiltrate into the CNS. *Immunol. Rev.*, 2012, Vol. 248, no. 1, pp. 140-155.
29. Kelley K.W., McCusker R.H. Getting nervous about immunity. *Semin. Immunol.*, 2014, Vol. 26, no. 5, pp. 389-393.
30. Kioussis D., Pachnis V. Immune and nervous systems: more than just a superficial similarity? *Immunity*, 2009, Vol. 31, no. 5, pp. 705-710.
31. Kipnis J., Gadani S., Derecki N.C. Pro-cognitive properties of T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 9, pp. 663-669.
32. Kipnis J. Multifaceted Interactions between adaptive immunity and the central nervous system. *Science*, 2016, Vol. 353, pp. 766-771.
33. Kivisäkk P., Imitola J., Rasmussen S., Elyaman W., Zhu B., Ransohoff R.M., Khoury S.J. Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.*, 2009, Vol. 65, no. 4, pp. 457-469.
34. Korn T., Kallies A. T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 3, pp. 179-194.
35. Kroken R.A., Sommer I.E., Steen V.M., Dieset I., Johnsen E. Constructing the immune signature of schizophrenia for clinical use and research; an integrative review translating descriptives into diagnostics. *Front. Psychiatry*, 2019, Vol. 9, 753. doi: 10.3389/fpsy.2018.00753.
36. Marin I.A., Kipnis J. Central nervous system: (immunological) ivory tower or not? *Neuropsychopharmacology*, 2017, Vol. 42, no. 1, pp. 28-35.
37. Marin I., Kipnis J. Learning and memory ... and the immune system. *Learn Mem.*, 2013, Vol. 20, no. 10, pp. 601-606.
38. Mouridsen S., Rich, B., Isager T. Psychiatric disorders in adults diagnosed as children with atypical autism. A case control study. *J. Neural Transm.*, 2008, Vol. 115, pp. 135-138.
39. Napolioni V., Ober-Reynolds B., Szelinger S., Corneveaux J.J., Pawlowski T., Ober-Reynolds S., Kirwan J., Persico A.M., Melmed R., Craig D., Smith C.J., Matthew J. Huentelman. Plasma cytokine profiling in sibling pairs discordant for autism spectrum disorder. *J. Neuroinflammation*, 2013, Vol. 10, 38. doi: 10.1186/1742-2094-10-38.
40. Pfau M.L., Russo S.J. Peripheral and central mechanisms of stress resilience. *Neurobiol. Stress.*, 2015, Vol. 1, pp. 66-79.
41. Prata J., Santos S.G., Almeida M. I., Coelho R., Barbosa M.A. Bridging autism spectrum disorders and schizophrenia through inflammation and biomarkers – pre-clinical and clinical investigations. *J. Neuroinflammation*, 2017, Vol. 14, no. 1, 179. doi: 10.1186/s12974-017-0938-y.
42. Raison C.L., Miller A.H. Malaise, melancholia and madness: the evolutionary legacy of an inflammatory bias. *Brain Behav. Immun.*, 2013, Vol. 31, pp. 1-8.
43. Ransohoff R.M., Kivisäkk P., Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, pp. 569-581.
44. Rapoport J., Chavez A., Greenstein D., Addington A., Gogtay N. Autism-spectrum disorders and childhood onset schizophrenia: clinical and biological contributions to a relationship revisited. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry*, 2009, Vol. 48, no. 1, pp. 10-18.

45. Réale D., Garant D., Humphries M.M., Bergeron P., Careau V. Montiglio P.O. Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2010, Vol. 365, pp. 4051-4063.
46. Saresella M., Marventano I., Guerini F.R., Mancuso R., Ceresa L., Zanzottera M., Rusconi B., Maggioni E., Tinelli C., Clerici M. An autistic endophenotype results in complex immune dysfunction in healthy siblings of autistic children. *Biol. Psychiatry.*, 2009, Vol. 66, no. 10, pp. 978-984.
47. Schläger C., Körner H., Krueger M., Vidoli S., Haberl M., Mielke D., Brylla E., Issekutz T., Cabañas C., Nelson P.J., Ziemssen T., Rohde V., Bechmann I., Lodygin D., Odoardi F., Flügel A. Effector T-cell trafficking between the leptomeninges and the cerebrospinal fluid. *Nature*, 2016, Vol. 530, pp. 349-353.
48. Sealey L.A., Hughes B.W., Sriskanda A.N., Guest J.R., Gibson A.D., Johnson-Williams L., Pace D.G., Bagasra O. Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. *Environment Int.*, 2016, Vol. 88, pp. 288-298.
49. Stefanik L., Erdman L., Ameis S.H., Foussias G., Mulsant B.H., Behdinan T., Goldenberg A., O'Donnell L.J., Voineskos A.N. Brain-behavior participant similarity networks among youth and emerging adults with schizophrenia spectrum, autism spectrum, or bipolar disorder and matched controls. *Neuropsychopharmacology*, 2018, Vol. 43, no. 5, pp. 1180-1188.
50. Stilling R.M., Bordenstein S.R., Dinan T.G., Cryan J.F. Friends with social benefits: host-microbe interactions as a driver of brain evolution and development? *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, Vol. 4, no. 147, pp. 1-17.
51. Tonhajzerova I., Ondrejka I., Mestanik M., Mikolka P., Hrtánek I. Mestanikova A., Bujnakova I. Mokra D. Inflammatory activity in autism spectrum disorder. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2015, Vol. 861, pp. 93-98.
52. Yirmiya R., Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav. Immun.*, 2011, Vol. 25, no. 2, pp. 181-213.
53. van Lange P.A.M., Rinderu M.I., Bushman B.J. Aggression and violence around the world: A model of CLimate, Aggression, and Self-control in Humans (CLASH). *Behav. Brain Sci.*, 2017, Vol. 40, e75. doi: 10.1017/S0140525X16000406.
54. Veiga-Fernandes H., Freitas A.A. The s(c)ensory immune system theory. *Trends Immunol.*, 2017, Vol. 38, no. 10, pp. 777-788.
55. Vorstman J.A.S., Burbach J.P.H. Autism and schizophrenia: genetic and phenotypic relationships. In: Patel V., Preedy V., Martin C. (eds) *Comprehensive Guide to Autism*. Springer, New York, 2014, pp. 1645-1662.

Авторы:

Бурмистрова А.Л. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Филиппова Ю.Ю. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Burmistrova A.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Filippova Yu. Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 08.03.2020

Отправлена на доработку 14.03.2020

Принята к печати 06.05.2020

Received 08.03.2020

Revision received 14.03.2020

Accepted 06.05.2020

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИ-GP2 АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И КОПРОФИЛЬТРАТАХ У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Топтыгина А.П.^{1,3}, Семикина Е.Л.^{2,4}, Петричук С.В.², Потапов А.С.^{2,4},
Сурков А.Н.²

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

² ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁴ ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), такие как болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), характеризуются хронически рецидивирующим воспалением кишечной стенки и связаны со значительным снижением качества жизни. Описан спектр генетических вариантов, ассоциированных с болезнью Крона. Пусковым фактором начала заболевания может быть дисбиоз кишечника (ДБ). Гликопротеин 2 (GP2), основной белок гранул зимогена поджелудочной железы, выделяется с пищеварительными ферментами в кишечник. Антитела против GP2 были обнаружены в крови пациентов с БК. Целью исследования было изучение уровня анти-GP2-антител в крови и фекалиях детей с ВЗК по сравнению с группой ДБ. Исследованы сыворотки крови и копрофильтраты от 110 детей (64 мальчика и 46 девочек) в возрасте 12,3 (2,6-17,9) года; 36 пациентов с БК, 30 пациентов с ЯК, группу сравнения составили 44 пациента с ДБ. Антитела IgG и IgA против GP2 тестировали методом ИФА. Применены методы непараметрической статистики, результаты представлены в процентах и медианах – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Уровни сывороточных IgA-антител против GP2 составили у пациентов с БК 9,97 (3,35-13,45) Ед/мл, для ЯК 6,08 (2,71-14,26) Ед/мл и для ДБ 2,94 (2,29-6,41) Ед/мл. Уровни анти-GP2 IgG-антител в сыворотках крови составили 6,16 (3,26-18,4) Ед/мл для БК, 5,26 (2,97-7,52) Ед/мл для ЯК и для ДБ 5,23 (2,53-8,85) Ед/мл. Пороговая концентрация cut-off для анти-GP2 антител класса IgG составила 13,8 Ед/мл, чувствительность – 63,2%, специфичность – 100%, а для IgA – 5,63 Ед/мл при чувствительности 60,5% и специфичности – 78,8%, что ниже рассчитанного cut-off взрослых – 20 Ед/мл. Уровни анти-GP2 IgG в копрофильтратах составили у детей группы сравнения 1,99 (1,26-3,04) Ед/мл, у пациентов с БК – 23,5 (16,15-29,3) Ед/мл и у детей с ЯК – 20,45 (13,63-25,5) Ед/мл, (p < 0,001). Cut-off составил 8,0 Ед/мл со 100% чувствительностью и 100% специфичностью. Концентрации IgA против GP2 в копрофильтратах больных с ВЗК значимо не отличались от ДБ. При этом

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.
Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Address for correspondence:

Toptygina Anna P.
G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology
125212, Russian Federation, Moscow, Adm. Makarov str., 10.
Phone: 7 (495) 452-18-01.
Fax: 7 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Образец цитирования:

А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина, С.В. Петричук, А.С. Потапов, А.Н. Сурков «Информативность определения анти-GP2 антител в сыворотке крови и копрофильтратах у детей с воспалительными заболеваниями кишечника» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 717-728.
doi: 10.15789/1563-0625-DVO-1998

© Топтыгина А.П. и соавт., 2020

For citation:

A.P. Toptygina, E.L. Semikina, S.V. Petrichuk, A.S. Potapov, A.N. Surkov "Diagnostic value of anti-GP2 antibodies determined in serum and coprofiltrates in children with inflammatory bowel disease", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 717-728.
doi: 10.15789/1563-0625-DVO-1998

DOI: 10.15789/1563-0625-DVO-1998

концентрация sIgA в копрофильтратах больных с ВЗК значимо превышала уровень группы с ДБ. Соотношение анти-GP2 IgA/sIgA было значительно ниже у пациентов с БК (0,326 (0,23-0,512)), и ЯК (0,327 (0,205-0,435)), чем у пациентов с ДБ (2,332 (1,575-3,523)) ($p < 0,001$); cut-off составил 0,784 с чувствительностью 97,7% и специфичностью 98,6%. Обсуждается, что анти-GP2 IgA антитела в фекалиях следует рассматривать как протективные, поддерживающие гомеостаз в кишечнике, а анти-GP2 IgG антитела являются патогенетически значимыми для развития ВЗК. Таким образом, используя неинвазивный метод определения анти-GP2 антител в стуле в случае превышения cut-off для IgG и снижения соотношения IgA/sIgA ниже cut-off, можно со 100% чувствительностью и 100% специфичностью дифференцировать ВЗК от ДБ, имеющего похожую клинику в начале заболевания.

Ключевые слова: GP2, антитела, болезнь Крона, язвенный колит, воспалительные заболевания кишечника

DIAGNOSTIC VALUE OF ANTI-GP2 ANTIBODIES DETERMINED IN SERUM AND COPROFILTRATES IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Toptygina A.P.^{a, c}, Semikina E.L.^{b, d}, Petrichuk S.V.^b, Potapov A.S.^{b, d}, Surkov A.N.^b

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

^b National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

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

^d First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Inflammatory bowel diseases (IBD), such as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), are characterized by chronically recurring inflammation of intestinal wall and are associated with a significant decrease in the quality of life. A spectrum of genetic variants associated with Crohn's disease is described. Intestinal dysbiosis (DB) may be the triggering factor of the disease. Glycoprotein 2 (GP2), the main protein of pancreatic zymogen granules, is secreted into the intestines with digestive enzymes. Anti-GP2 antibodies were found in the serum of patients with CD. The aim of the present study was to investigate the levels of anti-GP2 antibodies in serum and feces of children with IBD compared with the DB group. Serums and coprofiltrates from 110 children (64 boys and 46 girls) at the age of 12.3 (2.6-17.9) years were studied; 36 patients with CD, 30 patients with UC. A comparison group consisted of 44 patients with DB. IgG and IgA antibodies against GP2 were tested with ELISA. Nonparametric statistics methods are applied, the results are presented as percentages and medians (Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)). The serum levels of anti-GP2 IgA antibodies were 9.97 (3.35-13.45) U/ml for the CD patients, 6.08 (2.71-14.26) U/ml for UC and 2.94 (2.29-6.41) U/ml for DB. The levels of anti-GP2 IgG antibodies in serum were 6.16 (3.26-18.4) U/ml for CD, 5.26 (2.97-7.52) U/ml for UC, and for DB 5.23 (2.53-8.85) U/ml. The cut-off threshold concentration for anti-GP2 IgG antibodies was 13.8 U/ml, with sensitivity of 63.2%, specificity 100%, and for IgA 5.63 U/ml, with sensitivity of 60.5% and specificity of 78.8%, thus being lower than the calculated cut-off for adults (20 U/ml). The levels of anti-GP2 IgG in coprofiltrates in children of comparison group were 1.99 (1.26-3.04) U/ml; in the patients with CD, 23.5 (16.15-29.3) U/ml, and in children with UC, 20.45 (13.63-25.5) units/ml ($p < 0.001$). The cut-off value amounted 8.0 U/ml, with 100% sensitivity and 100% specificity. Concentrations of anti-GP2 IgA in coprofiltrates of patients with IBD did not significantly differ from DB patients. Moreover, the concentration of sIgA in the coprofiltrates of patients with IBD was significantly higher than their level in DB group. The anti-GP2 IgA/sIgA ratio was significantly lower in patients with CD (0.326 (0.23-0.512)), and UC (0.327 (0.205-0.435)), than in patients with DB (2.332 (1.575-3.523)) ($p < 0.001$); the cut-off level was 0.784, with a sensitivity of 97.7% and specificity of 98.6%. It is discussed, whether fecal anti-GP2 IgA antibodies should be considered as protective, supporting intestinal homeostasis, whereas anti-GP2 IgG antibodies are pathogenetically significant for development of IBD. Thus, using a non-invasive method for determining anti-GP2 antibodies in stool, when exceeding the cut-off for IgG, and reduction of IgA/sIgA ratio below the cut-off, one may differentiate IBD from DB with a similar symptoms at the onset of disease, with 100% sensitivity and 100% specificity.

Keywords: GP2, antibody, Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease

Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), такие как болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), характеризуются хронически рецидивирующим воспалением кишечной стенки и связаны со значительным снижением качества жизни [23]. В настоящее время не существует общей этиопатогенетической модели для всех форм ВЗК. В здоровом микробиоме кишечника существует оптимальное соотношение как про-, так и противовоспалительных микроорганизмов, которые обеспечивают сигналы для развивающейся иммунной системы, контролируемой геномом хозяина, что приводит к балансу активности Treg и Th17. Состав микробиоты кишечника может являться фактором риска для развития аутоиммунных или инфекционных заболеваний, которые зависят от баланса Treg/Th17. Клетки Treg и Th17 являются мощным средством, с помощью которого слизистая оболочка может быть защищена от нежелательных воспалительных реакций на микробиоту (посредством Treg) и в то же время эффективно реагировать на микробные инфекции (Th17-лимфоцитами). Важную роль в развитии ВЗК играют особенности организма – описан спектр генетических вариантов, ассоциированных с болезнью Крона [17, 19, 26]. Пусковым фактором для начала заболевания могут быть факторы окружающей среды, например дисбиоз кишечника (ДБ) – измененный состав микробиоты [7]. В составе кишечной микрофлоры выделены «провоспалительные» и «противовоспалительные» микроорганизмы. Так, противовоспалительным действием обладает *B. fragilis*. Эффект *B. fragilis* зависит от капсульного полисахарида А (PS-A). Воздействие PS-A *in vivo* и *in vitro* является достаточным для индукции выработки Treg и цитокинов (IL-10 и TGF- β). Моноколонизация безмикробных мышей *B. fragilis* индуцирует размножение CD4 Т-клеток и увеличивает количество Treg-лимфоцитов до уровней, сходных с таковыми у традиционно выращенных мышей [18]. Кроме того, была определена роль сегментированных нитчатых бактерий (segmented filamentous bacteria – SFB) в управлении развитием клеток Th17 в *lamina propria*. Колонизация безмикробных мышей штаммом SFB приводила к увеличению числа Th17 [11]. Увеличение количества провоспалительных микроорганизмов может способствовать повышению активности клеток Th17 и, таким образом, предрасполагать генетически восприимчивых людей к Th17-опосредованному аутоиммунному заболеванию [10]. Альтернативно уменьшение

или отсутствие противовоспалительных микробов может привести к недостаточному развитию субпопуляции Treg [6, 9]. Характерные изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови при ВЗК определяют эффективность биологической терапии [2]. Этот дисбаланс приводит к изменению цитокинового профиля в крови пациентов, но особенно эти изменения выражены на местном уровне [3]. Микробиота человека состоит в основном из анаэробов типа *Firmicutes* и *Bacteroidetes* [4]. У пациентов с БК было обнаружено уменьшение разнообразия в типе *Firmicutes*, в частности в группе *Clostridium leptum*. Известно, что *C. leptum* продуцирует бутират, короткоцепочечную жирную кислоту, которая является источником энергии для кишечного эпителия [28]. Было также показано, что бутират подавляет провоспалительную мРНК в энтероцитах. В нескольких независимых исследованиях было показано, что количество *Bacteroidetes*, *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium* и *Lachnospiraceae* особенно низкое у пациентов с БК, тогда как уровень *Actinobacteria*, *Escherichia/Shigella* и *Proteobacteria* повышен по сравнению со здоровыми людьми [13, 15].

Было показано, что гликопротеин 2 (GP2), основной белок гранул зимогена поджелудочной железы, выделяется с пищеварительными ферментами в кишечник [24]. Более того, оказалось, что GP2 может связывать FimH-позитивные бактерии [14]. Антитела против GP2 были обнаружены в крови пациентов с БК [5]. Антитела против GP2 были обнаружены также в фекальных образцах пациентов с БК, но этот факт был мало изучен [30].

Целью исследования было изучение уровня анти-GP2-антител в крови и фекалиях детей с ВЗК по сравнению с группой ДБ.

Материалы и методы

Обследовано 110 детей (64 мальчика и 46 девочек) в возрасте 12,3 (2,6-17,9) года. Когорта пациентов состояла из 36 пациентов с болезнью Крона, 30 пациентов с язвенным колитом, длительность заболевания – 51 (2-169) месяц (см. табл.1), группу сравнения составили 44 пациента с дисбиозом кишечника (ДБ). Диагноз «БК» или «ЯК» установлен на основании клинических данных и комплексного обследования с учетом лабораторных, эндоскопических и гистологических критериев (критерии Леннарда–Джонса) [16]. Фенотип заболевания был определен на основе Монреальской классификации [27, 29]. У детей с ДБ диагноз был подтвержден на основании микробиологического исследования кала. Исследование

было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено местными этическими комитетами. От родителей пациентов было получено письменное информированное согласие.

Образцы крови были взяты с использованием системы BD Vacutainer®. Антитела IgG и IgA против GP2 тестировали в образцах сыворотки и копрофильтратов с помощью коммерческого ИФА-набора (Generic Assays, Dahlewitz/Berlin, Германия) [25] в соответствии с инструкциями производителя. Для исследования использованы образцы сыворотки, взятые одновременно с проведением биохимического анализа крови. Для определения уровня антител в фекалиях готовились водно-солевые копрофильтраты: один объем фекалий смешивали с тремя объемами забуференного фосфатом солевого раствора и осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 минут.

Для статистической обработки результатов использовали пакет статистического программного обеспечения SPSS 15.0 (SPSS Inc., США). Применены методы непараметрической статисти-

стики, результаты представлены в процентах и медианах – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Значения $p < 0,05$ считали значимыми. Для оформления рисунков использовалось программное обеспечение Prizm (GraphPad Software Inc., США).

Результаты

Уровни сывороточных IgA и IgG антител против GP2 представлены в таблице 2. Из таблицы видно, что средние уровни анти-GP2 антител в сыворотке крови у детей с ВЗК, и особенно в группе БК, превышают средние уровни антител у детей контрольной группы с ДБ. Распределение индивидуальных значений уровней анти-GP2 IgG- и IgA-антител представлено на рисунке 1А, В.

Пороговое значение концентрации анти-GP2 антител cut-off, рассчитанное для взрослых, согласно рекомендации производителя тест-системы составляет 20 Ед/мл. Анализ результатов исследования у детей показал, что пороговые концентрации анти-GP2 антител у детей существенно отличаются от взрослых. Проведенный

ТАБЛИЦА 1. ДЕМОГРАФИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 36 ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА (БК) И 30 ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ (ЯК), ВКЛЮЧЕННЫХ В НАСТОЯЩЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

TABLE 1. DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE 36 PATIENTS WITH CROHN'S DISEASE (CD) AND THE 30 PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS (UC) INCLUDED IN THE PRESENT STUDY

Количество пациентов (n) Number of patients (n)	БК CD	ЯК UC
	36	30
Пол (м/ж) Sex (m/f)	24 (66,7%)/12 (33,3%)	19 (63,3%)/11 (36,7%)
Возраст (M±SD) годы Age (mean±SD) years	12,9±3,8	11,6±4,8
Длительность заболевания (M±SD), месяцы Disease duration (mean±SD), month	46,0±37,1	57,0±48,9
Расположение, n (%) Location, n (%)	L1: 7 (19,4%)	E1: 5 (16,7%)
	L2: 12 (33,3%)	E2: 4 (13,3%)
	L3: 17 (47,3%)	E3: 21 (70%)
Прогрессирование, n (%) Behaviour, n (%)	B1: 23 (63,9%)	
	B2: 5 (13,9%)	
	B3: 2 (5,5%)	
	P: 6 (16,7%)	
Возраст постановки диагноза, n (%) Diagnosis age, n (%)	A1: 36 (100%)	
	A2: 0 (0%)	
	A3: 0 (0%)	

Примечание. Фенотип заболевания определен на основе Монреальской классификации [27, 29].

Note. The phenotype of the disease is determined based on the Montreal classification [27, 29].

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ АНТИ-GP2 КЛАССОВ IgA И IgG АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (Ед/мл), Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. LEVELS OF THE ANTI-GP2 ANTIBODY OF IgG AND IgA CLASSES IN SERUM (U/ml), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Антитела Antibody	БК CD	ЯК UC	ДБ DB
GP2 IgG	6,16 (3,26-18,4)	5,26 (2,97-7,52)	5,23 (2,53-8,85)
GP2 IgA	9,97 (3,35-13,45)	6,08 (2,71-14,26)	2,94 (2,29-6,41)

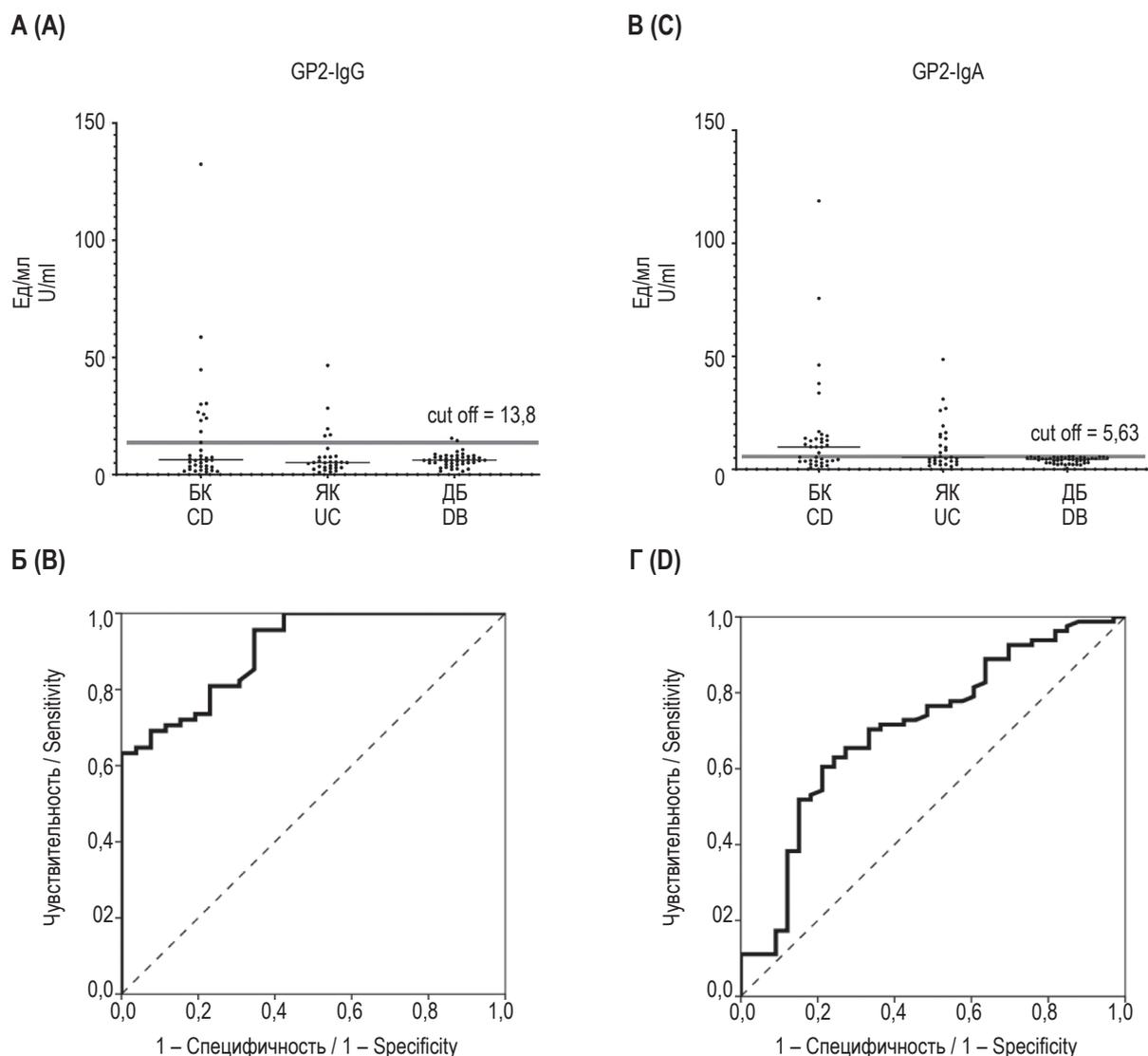


Рисунок 1. Результаты исследования уровней анти-GP2 антител классов G и A в сыворотке крови обследованных детей

Примечание. А – уровни анти-GP2 IgG-антител в сыворотке крови обследованных детей. Медианы по группам обозначены черными линиями. Уровень cut-off обозначен серой линией. Б – ROC-анализ уровней анти-GP2 IgG-антител в сыворотке крови обследованных детей. В – уровни анти-GP2 IgA-антител в сыворотке крови обследованных детей. Медианы по группам обозначены черными линиями. Уровень cut-off обозначен серой линией. Г – ROC-анализ уровней анти-GP2 IgA-антител в сыворотке крови обследованных детей.

Figure 1. Results of the anti-GP2 antibody of G and A classes levels study in the serum of the examined children

A, levels of anti-GP2 IgG antibodies in the serum of the examined children. Group medians are indicated by black lines. The cut-off level is indicated by a gray line. B, ROC-analysis of anti-GP2 IgG antibody levels in the serum of the examined children. C, levels of anti-GP2 IgA antibodies in the serum of the examined children. Group medians are indicated by black lines. The cut-off level is indicated by a gray line. D, ROC-analysis of anti-GP2 IgA antibody levels in the serum of the examined children.

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ROC-АНАЛИЗА УРОВНЕЙ АНТИ-GP2 АНТИТЕЛ КЛАССОВ IgA И IgG В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

TABLE 3. RESULTS OF THE ROC-ANALYSIS OF THE ANTI-GP2 ANTIBODY OF IgG AND IgA CLASSES LEVELS IN SERUM

Антитела Antibody	Площадь под кривой Area under the curve	Стандартная ошибка Standard error	95% доверительные интервалы 95% confidence interval		Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	Пороговый критерий Cut-off
			Нижний Lower	Верхний Upper			
GP2 IgG	0,904	0,032	0,842	0,966	63,2%	100%	13,8
GP2 IgA	0,710	0,054	0,603	0,816	60,5%	78,8%	5,63

ТАБЛИЦА 4. УРОВНИ АНТИ-GP2 КЛАССОВ IgA И IgG АНТИТЕЛ В КОПРОФИЛЬТРАТАХ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 4. LEVELS OF THE ANTI-GP2 ANTIBODY OF IgG AND IgA CLASSES IN THE COPROFILTRATES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Антитела Antibody	БК CD	ЯК UC	ДБ DB
GP2 IgG (Ед/мл) GP2 IgG (U/ml)	23,5 (16,15-29,3)	20,45 (13,63-25,5)	1,99 (1,26-3,04)
GP2 IgA (Ед/мл) GP2 IgA (U/ml)	280,9 (107,35-617,08)	215,8 (103,15-375,93)	305,2 (110-66,25)
slgA (мкг/мл) slgA (µg/ml)	1104,6 (431,73-1714,3)	821,8 (377,15-1736,2)	162,09 (50,09-261,65)
GP2IgA/slga	0,326 (0,23-0,512)	0,327 (0,205-0,435)	2,332 (1,575-3,523)

ТАБЛИЦА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ROC-АНАЛИЗА УРОВНЕЙ АНТИ-GP2 АНТИТЕЛ В КОПРОФИЛЬТРАТАХ

TABLE 5. RESULTS OF THE ROC-ANALYSIS OF THE ANTI-GP2 ANTIBODY IN THE COPROFILTRATES

Антитела в стуле Antibody in feces	Площадь под кривой Area under the curve	Стандартная ошибка Standard error	95% доверительные интервалы 95% confidence interval		Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	Пороговый критерий Cut-off
			Нижний Lower	Верхний Upper			
GP2 IgG	0,997	0,003	0,991	1,003	100%	100%	8,0
GP2 IgA/slga	0,998	0,002	0,993	1,002	97,7%	98,6%	0,784

ROC-анализ показал большую диагностическую ценность для анти-GP2 антител класса IgG (рис. 1Б) – пороговая концентрация cut-off для детей с ВЗК по сравнению с контрольной группой составила 13,8 Ед/мл, при этом чувствительность составила 63,2% при 100% специфичности. При определении антител IgA против GP2 у пациентов с ВЗК по сравнению с группой детей без ВЗК оптимальное соотношение чувствительности и специфичности получено при концентрации антител 5,63 Ед/мл (рис. 1Г). Чувствитель-

ность составила 60,5%, специфичность – 78,8% (табл. 3).

Как и у взрослых пациентов [20], анти-GP2-антитела в сыворотке крови были выявлены не у всех детей с ВЗК. Среди 36 пациентов с БК только у 10 (27,7%) антитела против GP2 превышали рассчитанный cut-off для IgG, а 20 (55,4%) имели антитела, превышающие рассчитанный cut-off для IgA. У пяти (16,6%) из 30 пациентов с ЯК концентрация анти-GP2 IgG превышала cut-off, и у 13 (43,3%) уровень IgA-антител против GP2 превышал cut-off. Ни у одного из 44 детей кон-

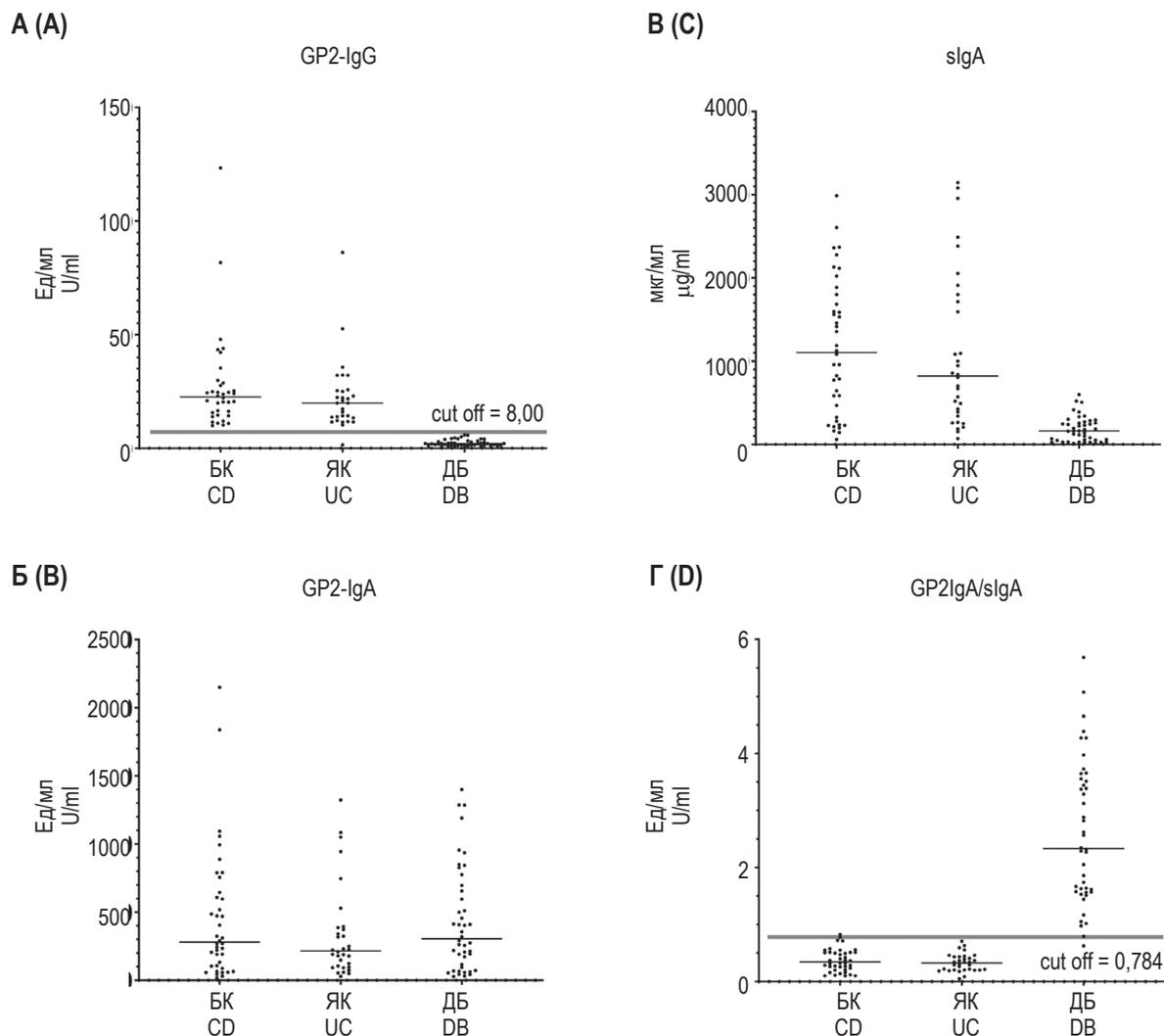


Рисунок 2. Результаты исследования уровней анти-GP2 антител классов G и A в копрофильтратах обследованных детей

Примечание. А – уровни анти-GP2 IgG-антител в копрофильтратах обследованных детей. Медианы по группам обозначены черными линиями. Уровень cut-off обозначен серой линией. Б – уровни анти-GP2 IgA-антител в копрофильтратах обследованных детей. Медианы по группам обозначены черными линиями. В – уровни секреторных IgA (slgA) в копрофильтратах обследованных детей. Медианы по группам обозначены черными линиями. Г – соотношение анти-GP2 IgA/slglA в копрофильтратах обследованных детей. Медианы по группам обозначены черными линиями. Уровень cut-off обозначен серой линией.

Figure 2. Results of the anti-GP2 antibody of G and A classes levels study in the coprofiltrates of the examined children

A, levels of anti-GP2 IgG antibodies in the coprofiltrates of the examined children. Group medians are indicated by black lines. The cut-off level is indicated by a gray line. B, levels of anti-GP2 IgA-antibodies in the coprofiltrates of the examined children. Group medians are indicated by black lines. C, levels of secretory IgA (slgA) in the coprofiltrates of the examined children. Group medians are indicated by black lines. D, ratio of anti-GP2 IgA/slglA in coprofiltrates of examined children. Group medians are indicated by black lines. The cut-off level is indicated by a gray line.

трольной группы с ДБ не выявлено анти-GP2 IgA, и только у 1 (3,3%) уровень анти-GP2 IgG превысил cut-off (15,5 Ед/мл). Уровень IgA-антител против GP2 в сыворотке пациентов с БК был значительно выше по сравнению с пациентами с ЯК ($p = 0,034$) и контрольной группой ($p = 0,0028$).

Уровни антител против GP2 в копрофильтратах у детей представлены в таблице 4. Из таблицы видно, что в копрофильтратах количество анти-

GP2 IgG антител у детей с ВЗК значительно превышают аналогичный уровень группы сравнения ($p < 0,001$) (рис. 2А). Cut-off, рассчитанный для IgG против GP2 в кале, составил 8,0 Ед/мл со 100% чувствительностью и 100% специфичностью (табл. 5).

Концентрации IgA против GP2 в копрофильтратах как для больных с БК, так и для больных с ЯК значительно не отличались от показателей кон-

трольной группы с ДБ (см. табл. 4 и рис. 2Б). Следует отметить, что IgA в кале присутствуют в виде секреторной формы sIgA. Исследование уровней sIgA в копрофильтрах выявило значимое превышение ($p < 0,001$) этого показателя у больных с ВЗК по сравнению с контрольной группой (см. табл. 4 и рис. 2В), что вполне объяснимо тяжелым воспалительным процессом у больных ВЗК. С учетом более высокого уровня анти-GP2 sIgA у пациентов с ВЗК было исследовано соотношение анти-GP2 IgA/sIgA. Оказалось, что соотношение анти-GP2 IgA/sIgA было значительно ниже у пациентов с БК и ЯК ($p < 0,001$), чем у пациентов с ДБ (см. табл. 4 и рис. 2Г). Рассчитанный cut-off составил 0,784 с чувствительностью 97,7% и специфичностью 98,6% (см. табл. 5).

Обсуждение

В результате проведенной работы удалось показать, что в крови детей с ВЗК имеются анти-GP2 антитела классов IgG и IgA, а в крови детей с ДБ таких антител не обнаруживается. Так же как и у взрослых пациентов, эти антитела обнаруживают не у всех пациентов, но у пациентов с БК чаще, чем с ЯК [8, 21, 22]. В отличие от взрослых, концентрации анти-GP2 антител у детей ниже и рассчитанные нами значения cut-off для детей также оказались ниже, чем у взрослых. Такие результаты вполне понятны, поскольку у детей иммунная система находится еще в процессе становления. Диагностическое значение для ВЗК имеет сывороточная концентрация анти-GP2 антител класса IgG, для которых площадь под кривой составила 0,904. Данный показатель имел 100% специфичность при чувствительности 63,2%. По-видимому, это связано с небольшим процентом детей с ВЗК, имеющих сывороточные анти-GP2-антитела.

Более интересные результаты были получены при исследовании анти-GP2 антител в фекалиях. Анти-GP2 IgA антитела были обнаружены у всех обследованных детей независимо от диагноза. Их количество в десятки и сотни раз выше, чем в крови, что в целом согласуется с имеющимися данными о физиологической секреции белка GP2. Несмотря на то, что GP2 белок открыт уже довольно давно, не вполне понятна его функция. Этот белок синтезируется в большом количестве в поджелудочной железе и выделяется вместе с пищеварительными ферментами при каждом поступлении пищи. Вопреки ожиданиям, GP2 белок не участвует в пищеварении [24]. Показано, что GP2 белок способен связываться с грам-бактериями, несущими фимбрию 1 типа [14]. Известно, что одной из функций sIgA является по-

мощь бактериям комменсалам в формировании биопленок. Это препятствует вымыванию благоприятной флоры из кишечника и создает условия для ее выживания и размножения [1]. Показано, что sIgA кишечника направлены к грам⁺ бактериям [20]. Мы считаем, что грам⁻ бактерии используют немного другой механизм: они связывают GP2 белок, а его, в свою очередь, связывают анти-GP2 sIgA антитела. Это позволяет различным видам грам⁻ бактерий, с одной стороны, образовывать единую биопленку, что дает преимущества для выживания, поскольку формируются пищевые цепочки разных бактерий, где метаболиты одних бактерий являются субстратом для других. С другой стороны, такой механизм взаимодействия антител с бактериями через GP2 препятствует повреждению бактерий антителами. Мы считаем, что анти-GP2 sIgA антитела в фекалиях являются протективными, способствуют выживанию грам⁻ комменсалов, поддерживая таким образом гомеостаз в кишечнике.

Уровень фекальных анти-GP2 IgA антител в нашем исследовании не показал достоверных различий от группы сравнения, хотя можно отметить тенденцию к снижению этого показателя у больных ВЗК. Эта тенденция к снижению вызывает большой интерес с учетом того, что общий уровень IgA в фекалиях у детей с ВЗК значительно выше группы сравнения. При этом особенно информативным представляется анализ соотношения анти-GP2 IgA к общему уровню секреторных IgA. Соотношение GP2-IgA/sIgA у пациентов с ВЗК оказалось значимо ниже, чем у детей группы сравнения: площадь под кривой составила 0,998 при чувствительности 97,7% и специфичности 98,6%, что характеризует высокую диагностическую значимость полученного нами порогового значения 0,784.

Известен еще один сайт синтеза GP2 белка — это М-клетки [14]. В данном случае GP2 является мембранным рецептором М-клеток, позволяющим связывать грам⁻ бактерии, несущие фимбрию 1-го типа. М-клетка использует GP2 для проведения таких бактерий в свой «карман» и дальнейшего предоставления их дендритным клеткам. Мы считаем, что уровень анти-GP2 IgG антител в фекалиях является патогенетически значимым для развития ВЗК. С учетом имеющихся данных, что повреждение именно М-клетки является тем первым очагом воспаления, с которого начинается ВЗК [12], можно предположить, что наличие анти-GP2 IgG-антител в просвете кишечника будет приводить к фиксации этих антител на М-клетках и к повреждению их с помощью одного из антителозависимых иммунологических

механизмов. Содержание анти-GP2 IgG антител в копрофильтрах у детей с ВЗК оказалось существенно выше, чем у детей группы сравнения. Более того, в отличие от довольно редких случаев обнаружения анти-GP2 IgG антител в сыворотке крови, анти-GP2 IgG антитела в копрофильтрах обнаруживались у 65 детей из 66 больных ВЗК и значительно превышали уровень соответствующих антител у детей из группы с ДБ, который практически не отличался от нуля. По-видимому, в здоровом организме нет анти-GP2 IgG антител. Образование анти-GP2 IgG антител ассоциировано с формированием очага воспаления в кишечной стенке. Далее образуется петля положительной обратной связи: чем больше уровень анти-GP2 IgG антител в кишечнике, тем больше они повреждают М-клетки и провоцируют воспаление кишечной стенки, а чем выше воспаление и нарушение целостности эпителиального барьера кишечника, тем больше анти-GP2 IgG антител оказывается в кишечном содержимом. Концентрация анти-GP2 IgG антител в копрофильтрах показала высокую диагностическую ценность: площадь под кривой составила 0,997 при 100% чувствительности и специфичности!

В результате нашей работы были рассчитаны cut-off для анти-GP2 антител классов IgA и IgG в

крови больных детей. Исследованы уровни анти-GP2 антител классов IgA и IgG в фекалиях детей с ВЗК, рассчитаны cut-off для анти-GP2 антител IgG в фекалиях и для соотношения GP2-IgA/sIgA антител в фекалиях, что позволяет со 100% чувствительностью и 100% специфичностью дифференцировать ВЗК от ДБ, имеющего похожую клинику в начале заболевания. Особенно важно, что предложенный метод является неинвазивным и не доставляет пациенту никаких неудобств, в отличие от классической эндоскопии с биопсией. Кроме того, мы предложили новую концепцию о роли анти-GP2 антител классов IgA и IgG в фекалиях. Было обнаружено повышение уровней анти-GP2 IgG антител и снижение анти-GP2 IgA антител, особенно соотношения GP2-IgA/sIgA. По нашему мнению, такие противоположно направленные соотношения анти-GP2 антител классов IgA и IgG в фекалиях связаны с разной ролью этих антител в патогенезе ВЗК. Анти-GP2 антитела класса IgA в фекалиях следует рассматривать как протективные, поддерживающие гомеостаз в кишечнике, а анти-GP2 антитела класса IgG являются патогенетически значимыми для развития ВЗК.

Список литературы / References

1. Климович В.Б. Защитные и гомеостатические функции секреторных иммуноглобулинов (SIG) // Российский иммунологический журнал, 2008. Т. 2 (11), № 2. С. 2-7. [Klimovich V.B. Protective and homeostatic functions of secretory immunoglobulins (SIG). *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2008, Vol. 2 (11), no. 2, pp. 2-7. (In Russ.)]
2. Петричук С.В., Мирошкина Л.В., Семикина Е.Л., Топтыгина А.П., Потапов А.С., Цимбалова Е.Г., Радыгина Т.В. Показатели популяционного состава лимфоцитов как предикторы эффективности терапии ингибитором TNF- α у детей с воспалительными заболеваниями кишечника // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 721-730. [Petrichuk S.V., Miroshkina L.V., Semikina E.L., Toptygina A.P., Potapov A.S., Tsimbalova E.G., Radygina T.V. Indicators of the lymphocyte subsets as efficiency predictors of therapy with inhibitors of TNF α in children with inflammatory bowel disease. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 721-730. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-721-730.
3. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Бобылева Г.В., Мирошкина Л.В., Петричук С.В. Цитокиновый профиль у детей с воспалительными заболеваниями кишечника // Биохимия, 2014. Т. 79, № 12. С. 1673-1679. [Toptygina A.P., Bobyleva G.V., Semikina E.L., Miroshkina L.V., Petrichuk S.V. Cytokine profile in children with inflammatory bowel disease. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2014, Vol. 79, no. 12, pp. 1371-1375. (In Russ.)]
4. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, Vol. 473, pp. 174-180.
5. Bogdanos D.P., Rigopoulou E.I., Smyk D.S., Roggenbuck D., Reinhold D., Forbes A., Laass M.W., Conrad K. Diagnostic value, clinical utility and pathogenic significance of reactivity to the molecular targets of Crohn's disease specific-pancreatic autoantibodies. *Autoimmun. Rev.*, 2011, Vol. 11, pp. 143-148.
6. Chao K., Zhang S., Yao J., He Y., Chen B., Zeng Z., Zhong B., Chen M. Imbalances of CD4(+) T-cell subgroups in Crohn's disease and their relationship with disease activity and prognosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, Vol. 29, pp. 1808-1814.
7. Cobrin G.M., Abreu M.T. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol. Rev.*, 2005, Vol. 206, pp. 277-295.

8. de Beéck K.O., Vermeire S., Rutgeerts P., Bossuyt X. Antibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, in inflammatory bowel diseases. *Gut*, 2012, Vol. 61, pp. 162-164.
9. Fonseca-Camarillo G., Yamamoto-Furusho J.K. Immunoregulatory pathways involved in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2015, Vol. 21, no. 9, pp. 2188-2193.
10. Fujino S., Andoh A., Bamba S., Ogawa A., Hata K., Araki Y., Bamba T., Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2003, Vol. 52, pp. 65-70.
11. Gaboriau-Routhiau V., Rakotobe S., Lecuyer E., Mulder I., Lan A., Bridonneau C., Rochet V., Pisi A., de Paepe M., Brandi G., Eberl G., Snel J., Kelly D., Cerf-Bensussan N. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, 2009, Vol. 31, no. 4, pp. 677-689.
12. Gullberg E., Söderholm J.D. Peyer's patches and M cells as potential sites of the inflammatory onset in Crohn's disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2006, Vol. 1072, pp. 218-232.
13. Hansen R., Russell R.K., Reiff C., Louis P., McIntosh F., Berry S.H., Mukhopadhyia I., Bisset W.M., Barclay A.R., Bishop J., Flynn D.M., McGrogan P., Loganathan S., Mahdi G., Flint H.J., El-Omar E.M., Hold G.L. Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased *Faecalibacterium prausnitzii* and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.*, 2012, Vol. 107, pp. 1913-1922.
14. Hase K., Kawano K., Nochi T., Pontes G.S., Fukuda S., Ebisawa M., Kadokura K., Tobe T., Fujimura Y., Kawano S., Yabashi A., Waguri S., Nakato G., Kimura S., Murakami T., Iimura M., Hamura K., Fukuoka S., Lowe A.W., Itoh K., Kiyono H., Ohno H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH⁺ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*, 2009, Vol. 462, no. 7270, pp. 226-230.
15. Hold G.L., Smith M., Grange C., Watt E.R., El-Omar E.M., Mukhopadhyia I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 5, pp. 1192-1210.
16. Lennard-Jones J.E. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol., Suppl.*, 1989, Vol. 170, pp. 2-6.
17. Liu J.Z., van Sommeren S., Huang H., Ng S.C., Alberts R., Takahashi A., Ripke S., Lee J.C., Jostins L., Shah T., Abedian S., Cheon J.H., Cho J., Dayani N.E., Franke L., Fuyuno Y., Hart A., Juyal R.C., Juyal G., Kim W.H., Morris A.P., Poustchi H., Newman W.G., Midha V., Orchard T.R., Vahedi H., Sood A., Sung J.Y., Malekzadeh R., Westra H.J., Yamazaki K., Yang S.K.; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; International IBD Genetics Consortium, Barrett J.C., Alizadeh B.Z., Parkes M., Bk T., Daly M.J., Kubo M., Anderson C.A., Weersma R.K. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat. Genet.*, 2015, Vol. 47, no. 9, pp. 979-986.
18. Mazmanian S.K., Round J.L., Kasper D.L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 2008, Vol. 453, pp. 620-625.
19. McGovern D., Kugathasan S., Cho J.H. Genetics of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2015, Vol. 149, no. 5, pp. 1163-1176.
20. Palm N.W., De Zoete M.R., Cullen T.W., Barry N.A., Stefanowski J., Hao L., Degnan P.H., Hu J., Peter I., Zhang W., Ruggiero E., Cho J.H., Goodman A.L., Flavell R.A. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*, 2014, Vol. 158, pp. 1000-1010.
21. Pavlidis P., Forbes A., Bogdanos D.P. Antibodies to glycoprotein 2 (GP2) in patients with inflammatory bowel diseases from UK. *Clin. Chim. Acta*, 2011, Vol. 412, no. 11-12, pp. 1163-1164.
22. Pavlidis P., Romanidou O., Roggenbuck D., Mytilinaiou M.G., Al-Sulttan F., Liaskos C., Smyk D.S., Koutsoumpas A.L., Rigopoulou E.I., Conrad K., Forbes A., Bogdanos D.P. Ileal inflammation may trigger the development of GP2-specific pancreatic autoantibodies in patients with crohn's disease. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, Vol. 2012, 640835. doi: 10.1155/2012/640835.
23. Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2002, Vol. 16, pp. 933-943.
24. Roggenbuck D., Hausdorf G., Martinez-Gamboa L., Reinhold D., Büttner T., Jungblut P.R., Porstmann T., Laass M.W., Henker J., Büning C., Feist E., Conrad K. Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. *Gut*, 2009, Vol. 58, no. 12, pp. 1620-1628.
25. Roggenbuck D., Reinhold D., Wex T., Goihl A., von Arnim U., Malferteiner P., Büttner T., Porstmann T., Porstmann S., Liedvogel B., Bogdanos D.P., Laass M.W., Conrad K. Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, are new markers in Crohn's disease. *Clin. Chim. Acta*, 2011, Vol. 412, no. 9-10, pp. 718-724.
26. Russell R. K., Drummond H. E., Nimmo E. E. Anderson N., Smith L., Wilson D.C., Gillett P.M., McGrogan P., Hassan K., Weaver L.T., Bisset M., Mahdi G., Satsangi J. Genotype-phenotype analysis in childhood-onset Crohn's disease: NOD2/CARD15 variants consistently predict phenotypic characteristics of severe disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2005, Vol. 11, pp. 955-964.
27. Satsangi J., Silverberg M. S., Vermeire S., Colombel J.-F. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 2006, Vol. 55, no. 6, pp. 749-753.

28. Sha S., Xu B., Wang X., Zhang Y., Wang H., Kong X., Zhu H., Wu K. The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 75, pp. 245-251.
29. Silverberg M.S., Satsangi J., Ahmad T., Arnott I.D., Bernstein C.N., Brant S.R., Caprilli R., Colombel J.F., Gasche C., Geboes K., Jewell D.P., Karban A., Loftus E.V. Jr, Peña A.S., Riddell R.H., Sachar D.B., Schreiber S., Steinhart A.H., Targan S.R., Vermeire S., Warren B.F. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canad. J. Gastroenterol.*, 2005, Vol. 19, Suppl. A, pp. 5A-36A.
30. Werner L., Sturm A., Roggenbuck D., Yahav L., Zion T., Meirowitz E., Ofer A., Guzner-Gur H., Tulchinsky H., Dotan I. Antibodies against glycoprotein 2 are novel markers of intestinal inflammation in patients with an ileal pouch. *J. Crohn's Colitis*, 2013, Vol. 7, no. 11, pp. e522-e532.

Авторы:

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

Семикина Е.Л. — д.м.н., заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Петричук С.В. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Topotygina A.P., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Cytokines, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Head, Central Diagnostic Laboratory, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Petrichuk S.V., PhD, MD (Biology), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Потапов А.С. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории разработки новых технологий и лечения болезней детского возраста ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Сурков А.Н. — д.м.н., заведующий гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Potapov A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory for Development of New Technologies for Diagnostics and Treatment of Childhood Diseases, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Surkov A.N., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Gastroenterology with Hepatology Group, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Поступила 06.04.2020
Отправлена на доработку 30.04.2020
Принята к печати 06.05.2020

Received 06.04.2020
Revision received 30.04.2020
Accepted 06.05.2020

ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАТА НАТРИЯ НА ПРОТИВОИНФЕКЦИОННУЮ ЗАЩИТУ И КРОВЕТВОРЕНИЕ У ПОСТРАДАВШИХ С ПОЛИТРАВМОЙ (РАНДОМИЗИРОВАННОЕ ПРОСПЕКТИВНОЕ, ДВОЙНОЕ СЛЕПОЕ ПЛАЦЕБО-КОНТРОЛИРУЕМОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

**Пивоварова Л.П., Громов М.И., Тулупов А.Н., Лапшин В.Н.,
Осипова И.В., Арискина О.Б., Никитин А.В., Малышев М.Е.,
Маркелова Е.В.**

*ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе»,
Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Цель исследования – изучение влияния дезоксирибонуклеата натрия на противомикробную резистентность и кроветворение у пострадавших с политравмой. Проведено одноцентровое исследование эффективности дезоксирибонуклеата натрия (низкомолекулярных фрагментов нативной ДНК) у 54 пациентов с политравмой. Основная группа – 27 чел., возраст 39 (29-51) лет, тяжесть травмы ISS 26 (22-34) баллов, тяжесть шока $\pm T = +12,9$ (8,7-15,9) часов. Группа сравнения – 27 чел., возраст 40 (26-53), ISS 25 (20-29), $\pm T = +12,3$ (9,3-13,8). Рандомизация: пациентам со случайным четным числом вводили 5 мл содержимого флаконов одной серии (четной), с нечетным числом – другой серии (нечетной) внутримышечно ежедневно с первого по 10 день после травмы. Перед введением препарата, на 8-е, 15-е дни после травмы исследовали в крови: лейкоциты ($\times 10^9/л$), эритроциты ($\times 10^{12}/л$), IL-6 (пг/мл), СРБ (мг/л), CD117⁺ и CD34⁺ мононуклеары, CD14⁺ моноциты, CD14⁺ гранулоциты, HLA-DR⁺ мононуклеары ($\times 10^9/л$), дефенсин + гранулоциты (HNP1-3) (%); гемоглобин (Hb) и общий белок (ОБ) (г/л) крови – в течение госпитализации. На 7-е сутки у пациентов основной группы по сравнению с группой сравнения возросло количество лимфоцитов ($2,36 \pm 0,19/1,83 \pm 0,18$; $p = 0,048$), моноцитов ($0,89 \pm 0,07/0,69 \pm 0,007$; $p = 0,049$), CD117⁺ ($0,81 \pm 0,07/0,44 \pm 0,07$; $p = 0,001$) и CD34⁺ ($0,83 \pm 0,07/0,65 \pm 0,05$; $p = 0,042$) мононуклеаров. На 14-е сутки в основной группе возросло по сравнению с группой сравнения количество CD14⁺ моноцитов ($0,38 \pm 0,03/0,24 \pm 0,02$; $p = 0,041$), HLA-DR⁺ мононуклеаров ($1,34 \pm 0,12/1,04 \pm 0,08$; $p = 0,044$), дефенсин + гранулоцитов ($42,0 \pm 2,4/34,3 \pm 3,7$; $p = 0,044$). У пациентов обеих групп наблюдали сходное снижение концентраций IL-6 и СРБ. Применение препарата способствовало сокращению госпитализации с 39,6 до 32,8 дней, уменьшению количества осложнений с 39 до 21 в сравниваемых группах. В основной группе среднее количество осложнений у одного пациента было в 1,8 раза меньше, чем в группе сравнения

Адрес для переписки:

Пивоварова Людмила Павловна
ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе»
192242, Россия, Санкт-Петербург, ул. Будапештская, 3.
Тел.: 8 (812) 384-46-68.
Факс: 8 (812) 384-46-46.
E-mail: pivovaroval@yandex.ru

Address for correspondence:

Pivovarova Lyudmila P.
St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency
Medicine
192242, Russian Federation, St. Petersburg, Budapest str., 3.
Phone: 7 (812) 384-46-68.
Fax: 7 (812) 384-46-46.
E-mail: pivovaroval@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.П. Пивоварова, М.И. Громов, А.Н. Тулупов,
В.Н. Лапшин, И.В. Осипова, О.Б. Арискина,
А.В. Никитин, М.Е. Малышев, Е.В. Маркелова
«Влияние дезоксирибонуклеата натрия на
противомикробную защиту и кроветворение
у пострадавших с политравмой (рандомизированное
проспективное, двойное слепое плацебо-
контролируемое исследование)» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 729-740.
doi: 10.15789/1563-0625-IOS-1923

© Пивоварова Л.П. и соавт., 2020

For citation:

L.P. Pivovarova, M.I. Gromov, A.N. Tulupov,
V.N. Lapshin, I.V. Osipova, O.B. Ariskina, A.V. Nikitin,
M.E. Malyshev, E.V. Markelova “Influence of sodium
desoxyribonucleate on anti-infectious protection and
hematopoiesis in patients with polytrauma (randomized
prospective, double-blind, placebo-controlled study)”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 4, pp. 729-740.
doi: 10.15789/1563-0625-IOS-1923

DOI: 10.15789/1563-0625-IOS-1923

($p = 0,014$). При развитии осложнений: продолжительность анемии ($Hb < 90$ г/л) и гипопропротеинемии ($ОБ < 60$ г/л) в основной группе была меньше, чем в группе сравнения в 2,5 ($p = 0,044$) и 3,5 раза ($p = 0,034$) соответственно.

Применение дезоксирибонуклеата натрия при политравме усиливало миграцию предшественников кроветворения в кровоток, способствовало повышению противоинфекционных свойств лейкоцитов, уменьшению продолжительности анемии и гипопропротеинемии, сокращению количества осложнений и срока госпитализации.

Ключевые слова: политравма, противоинфекционная защита, кроветворение, гипопропротеинемия, осложнения, дезоксирибонуклеат натрия

INFLUENCE OF SODIUM DESOXYRIBONUCLEATE ON ANTI-INFECTIOUS PROTECTION AND HEMATOPOIESIS IN PATIENTS WITH POLYTRAUMA (RANDOMIZED PROSPECTIVE, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED STUDY)

Pivovarova L.P., Gromov M.I., Tulupov A.N., Lapshin V.N., Osipova I.V., Ariskina O.B., Nikitin A.V., Malyshev M.E., Markelova E.V.

St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to evaluate the effect of sodium deoxyribonucleate on anti-infectious resistance and hematopoiesis in patients with polytraumas. A single-center study of sodium deoxyribonucleate effectiveness approved by the local Ethics Committee (protocol No. 4 05/18/2016), was conducted in 54 patients with polytrauma. The main group included 27 people, at the mean age of 39 (29-51) years old; ISS severity score, 26 (22-34). The comparison group comprised 27 people, mean age, 40 years old (26-53), mean ISS severity score was 25 points (20 to 29). The patients with randomly attributed even numbers were injected with 5 ml preparation from vials of even-numbered series, the patients with odd numbers were treated with preparation from the odd-numbered series. They were injected intramuscularly daily from day 1 to day 10 after the injury. Before treatment, as well as on days 8, 15 after injury, peripheral blood was examined for leukocyte, erythrocyte counts, hemoglobin, total protein, blood IL-6, CRP; proportion of $CD117^+$ and $CD34^+$ mononuclear cells, $CD14^+$ monocytes, $CD14^+$ granulocytes, HLA-DR⁺ mononuclear cells, defensin + granulocytes.

On the day +8, patients from the main group, against the comparison group showed an increase in lymphocytes, monocytes, $CD117^+$ and $CD34^+$ cell counts. Serum IL-6 and CRP were decreased in both groups of the patients to a similar degree. Terms of hospitalization in the main group were 32.8 days, against 39.6 in comparison group. The number of complications per 1 case was, respectively, 21 versus 39, thus being 1.8 times less than in comparison group. When developing complications, anemia ($Hb < 90$ g/l), or hypoproteinaemia (< 60 g/l) in the main group was, respectively, 2.5- and 3.5-fold less than in the comparison group.

Treatment with sodium deoxyribonucleate in polytrauma may promote migration of blood precursors to the bloodstream, increase anti-infectious properties of leukocytes, reduce duration of anemia and hypoproteinemia, number of complications and decrease the terms of hospitalization.

Keywords: polytrauma, anti-infection protection, hematopoiesis, hypoproteinemia, complications, sodium deoxyribonucleate

Введение

Политравма сопровождается кровопотерей, обширными повреждениями тканей и развитием системного воспаления, которые создают повышенную нагрузку на иммунную и кроветворную системы в силу утраты части клеточных элемен-

тов и последующего их повышенного потребления в процессах противоинфекционной защиты и репарации. Недостаточные резервы организма для восстановления перечисленных нарушений создают предпосылки для развития различного рода осложнений, влияющих на длительность и эффективность проводимого лечения [1, 14].

В ходе лечения таких пациентов оправдано использование иммунокорректирующих средств, которые поддерживают кроветворение и противоинфекционную защиту и, принципиально важно, не усиливают воспаление, что ограничивает выбор средств, удовлетворяющих этим условиям. Так, в лечении пострадавших с политравмой была показана эффективность внутривенного введения иммуноглобулинов, направленного на ограничение системного воспаления и одновременно активацию фагоцитоза [22]. Д.Р. Ивченко и соавт. [7] приводят данные об эффективности использования синтетических препаратов (бес-тим, галавит), усиливающих противоинфекционные свойства моноцитов крови и не вызывающих активацию системного воспаления. Перспективными средствами для коррекции нарушений кроветворения при сочетанной травме являются препараты, созданные на основе нуклеиновых кислот и применяемые для восстановления кроветворения у пациентов с лучевой болезнью, после химиотерапии, при тяжелом сепсисе [6, 8].

Установлено, что для реализации биологической активности содержащих ДНК препаратов важным моментом является сохранение нативной (неденатурированной) формы дезоксирибонуклеата. Такие препараты повышают пролиферативную активность костного мозга и интенсивность работы клеток ретикуло-эндотелиальной системы, однако они не исследовались при лечении пострадавших с политравмой [6, 8].

Регуляторное действие ДНК осуществляется на клеточном уровне посредством концевых CpG фрагментов ДНК, как метилированных, так неметилированных [26]. Препарат дезоксирибонуклеата натрия Деринат® на концевых участках полипептидных цепочек содержит не менее 50% неметилированных CpG фрагментов, являющихся лигандами эндосомального толл-подобного рецептора 9 (TLR9) [15]. В эксперименте на мышах было выявлено, что местное применение дезоксирибонуклеата натрия уменьшало отек и повреждение кожи в области пролежней. Данный эффект достигался за счет подавления локального окислительного стресса, вызываемого ишемией-реперфузией на тканевом уровне [23].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении влияния дезоксирибонуклеата натрия на противоинфекционную защиту и кроветворение у пострадавших с политравмой.

Материалы и методы

Деринат® – коммерческий препарат дезоксирибонуклеата натрия – (ЗАО «Техномедсервис», Россия, регистрационный № Р N002916/01) представляет собой низкомолекулярные фрагменты нативной ДНК, полученные из молок осетровых

рыб. При введении в организм повышенное накопление и потребление препарата происходит в наиболее активно делящихся клетках – в клетках костного мозга, иммунной системы, кожи и слизистых оболочек [8].

Дизайн исследования – проспективное рандомизированное, двойное слепое плацебо-контролируемое. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом (протокол № 4 от 18.05.2016 г.).

Критериями включения в исследование были: возраст пострадавших от 18 до 70 лет, наличие травматического шока II (средней) степени тяжести и III (тяжелой) степени с вероятной летальностью менее 50% (прогноз длительности шока $\pm T$ от +7,5 часов до +48 часов) по Ю.Н. Цибину [16].

Критерии невключения: венерические заболевания, вирусный гепатит, ВИЧ, хроническая почечная недостаточность, эндокринная патология, хронические заболевания, требующие приема противовоспалительных препаратов, хроническая алкогольная или наркотическая зависимость, беременность.

Исследуемый препарат и плацебо имели разные по четности серии выпуска. Ни пациенты, ни медицинский персонал не знали, в какой из серий находится действующее вещество. Всем пострадавшим вводили по одному флакону (5,0 мл) препарата/плацебо внутримышечно ежедневно однократно в течение 10 дней, начиная со следующего дня после травмы. Рандомизация осуществлялась на основе генерации 60 случайных чисел. Пациенту с присвоенным случайным четным числом вводилась четная серия препарата, с нечетным – нечетная.

Из 60 последовательно включенных в исследование пострадавших с политравмой (май 2016 – май 2018) в итоговый анализ вошли 54 пациента. Из них 27 человек составили основную группу – I (с применением Дерината®) и 27 – группу сравнения – II (с плацебо). 6 пострадавших были исключены из исследования (перевод в другой стационар, выявление беременности).

Тяжесть полученных повреждений оценивали по шкале ISS [17]; комплексную оценку тяжести травмы и травматического шока, а также вероятный исход рассчитывали по прогностической формуле Ю.Н. Цибина ($\pm T$) [16]. Развивающиеся осложнения учитывали с выделением угрожающих и не угрожающих жизни, а также инфекционных и неинфекционных.

Контрольные значения лабораторных показателей получены при обследовании 28 практически здоровых взрослых в возрасте 18-70 лет.

Всем пациентам проведено клиническое, инструментальное и лабораторное обследование в соответствии с клиническими рекомендациями.

Дополнительно исследовали состояние иммунитета и кроветворения перед первым введением препарата и далее через 7 и 14 дней (соответственно, через 1, 8 и 15 дней после травмы). Оценивали количество форменных элементов крови и содержание гемоглобина (Hb) (гематологический анализатор Sysmex XT4000, Япония). Определяли фенотипические и активационные маркеры клеток крови иммуноцитохимическим методом с использованием системы визуализации (Novolink Polymer Detection Systems, Великобритания) и моноклональных антител (Leica Biosystems, Великобритания): относительное и абсолютное количество клеток, экспрессирующих рецептор фактора стволовых клеток CD117⁺ (NCL cKIT) и адгезионный рецептор стволовых клеток CD34 (RTU-END), CD14⁺ моноцитов и CD14⁺ нейтрофильных гранулоцитов

(НГ) (NCL-CD14), HLA-DR⁺ мононуклеаров (NCL-LN3), дефенсин⁺ нейтрофильных гранулоцитов, (human neutrophil peptides, HNP 1-3) (Def⁺НГ). Также определяли концентрацию в крови IL-6 (ИФА, АО «Вектор Бест», Россия), С-реактивного белка (СРБ) и общего белка (ОБ) (Cobas 6000, с501, Швейцария). Содержание Hb и ОБ в крови пациентов оценивали в течение всего срока госпитализации. У каждого больного подсчитывали количество дней с зафиксированной анемией (Hb < 90 г/л) и гипопроотеинемией (ОБ < 60 г/л).

Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета прикладных программ Statistica 10. Описательная статистика таблиц представлена показателями средней величины и ее средней ошибки (M±m), а также расчетом процентных долей. Оценка различий количе-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСТРАДАВШИХ И РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 1. CHARACTERIZATION OF PATIENTS AND TREATMENT RESULTS

Показатели Indicators	Группы Groups	
	I	II
Количество пациентов Number of patients	27	27
Мужчины (%) Male (%)	21 (78%)	20 (74%)
Возраст, лет Age, years	39 (29-51)	40 (26-53)
Автотравма/кататравма, количество Caraccident/catastrauma, number	22/5	21/6
Шок II степени (%) Shock II degree (%)	17 (63%)	16 (59%)
Шок III степени (%) Shock III degree (%)	10 (37%)	11 (41%)
Тяжесть травмы ISS, баллы Injury severe score, points	26 (22-34)	25 (20-29)
Тяжесть шока ±Т, часы Shock score ±T, hours	+12,9 (8,7-15,9)	+12,3 (9,3-13,8)
Объем гемотрансфузий всего, л Total blood transfusion volume, l	1,8 (0,8-2,5)	1,8 (1,1-2,0)
Средняя длительность госпитализации, сутки Average duration of hospitalization, day	32,8	39,6
Умерли Died	1	2
Количество пациентов с осложнениями Number of patients with complications	13	14
Количество пациентов без осложнений Number of patients without complications	14	13
Общее количество осложнений Total number of complications	21	39

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ

TABLE 2. CONTENT OF THE MAIN POPULATIONS OF WHITE BLOOD CELLS IN PATIENTS

Показатели/ контроль, здоровые взрослые Indicators/control level, healthy adults	Группы пациентов Patient groups	До инъекции Before injection	Через 7 суток After 7 days	Через 14 суток After 14 days	P _{1,2}	P _{1,3}
		1	2	3		
Лимфоциты, 1,88±0,39 × 10⁹/л Lymphocytes, 1.88±0.39 × 10 ⁹ /l	I	1,33±0,09	2,36±0,19	2,04±0,16	0,000	0,000
	II	1,19±0,11 p = 0,329	1,83±0,18 p = 0,048	1,82±0,17 p = 0,352	0,004	0,003
Моноциты, 0,34±0,13 × 10⁹/л Monocytes, 0.34±0.13 × 10 ⁹ /l	I	0,56±0,05	0,89±0,07	0,65±0,07	0,000	0,301
	II	0,54±0,06 p = 0,799	0,69±0,07 p = 0,049	0,46±0,05 p = 0,033	0,110	0,311
Нейтрофилы, 3,1±0,8 × 10⁹/л Neutrophils, 3.1±0.8 × 10 ⁹ /l	I	9,5±0,6	7,0±0,5	5,9±0,5	0,013	0,001
	II	9,6±0,7 p = 0,914	6,9±0,5 p = 0,888	5,5±0,6 p = 0,611	0,014	0,002

Примечание. p – статистическая значимость различий между группами по U-критерию Манна–Уитни. p – статистическая значимость различий по критерию Вилкоксона: p_{1,2} – между 1 и 2 сроками наблюдения, p_{1,3} – между 1 и 3 сроками наблюдения.

Note. p, statistical significance of differences between groups according to the Mann–Whitney U test. p, statistical significance of differences to the Wilcoxon test: p_{1,2}, between 1 and 2 periods of observation; p_{1,3}, between 1 and 3 periods of observation.

ственных показателей произведена с помощью непараметрических критериев: при межгрупповом сравнении – по критерию Манна–Уитни, при внутригрупповом – по тесту Вилкоксона. Достоверной считалась статистическая значимость различий p < 0,05.

Результаты

Пострадавшие обеих групп не различались по возрасту, полу, тяжести повреждений (ISS) и шока (±T), характеру полученных повреждений, объему гемотрансфузионной терапии (табл. 1).

Не было выявлено различий между группами по частоте встречаемости и доминирующей роли повреждений различных частей тела, а также по содержанию проведенного оперативного и консервативного лечения.

На следующие день после травмы пациенты группы I не отличались от группы II по уровню в крови гемоглобина (Hb, г/л -107±3 и 104±4, p = 0,551) и общего белка (ОБ, г/л – 56±1 и 54±2, p = 0,189) соответственно.

Анализ состояния пациентов в ходе стационарного этапа показал, что у 17% всех пациентов с политравмой (5 в группе I и 4 в группе II) отсутствовали какие-либо осложнения. У 33% (9 в группе I и 9 в группе II) отмечали развитие только анемии и/или гипопроотеинемии. У 50% пациентов (13 в группе I и 14 в группе II) были выявлены

как лабораторные признаки анемии и/или гипопроотеинемии, так и клинические осложнения.

Результаты мониторинга состояния кроветворения и иммунитета у пациентов представлены в таблице 2. При сравнительном исследовании количества форменных элементов крови в группе I (получавших Деринат) на 7-е сутки наблюдения выявили достоверно более высокие уровни лимфоцитов и моноцитов по сравнению с группой II. Количество гранулоцитов в обеих группах не различалось в течение всего периода наблюдения.

С целью оценки влияния препарата на ранний этап кроветворения и связанного с ним репаративного процесса исследовали содержание в крови CD117⁺ и CD34⁺ клеток (табл. 3). У пациентов обеих групп исходное содержание этих клеток перед первым введением препарата превышало значение нормы в 3-3,5 раза. Через 7 суток в группе I наблюдали достоверное увеличение количества CD117⁺ клеток в 1,8 раза, в отличие от группы II, где количество этих клеток не изменялось на протяжении всего срока наблюдения. Количество CD34⁺ мононуклеаров через 7 суток достоверно возрастало как у пациентов группы I (в 1,46 раза), так и группы II (в 1,41 раза). При этом в группе I абсолютное количество этих клеток оказалось достоверно большим.

О состоянии ранней противоинойфекционной защиты можно судить по уровню содержания в крови CD14⁺ моноцитов, CD14⁺НГ, HLA-DR⁺

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ CD14⁺, HLA-DR⁺, CD117⁺, CD34⁺ МОНОНУКЛЕАРОВ, CD14⁺ И ДЕФЕНСИН⁺ НЕЙТРОФИЛЫ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 3. CONTENT OF CD14⁺, HLA-DR⁺, CD117⁺, CD34⁺ MONONUCLEARS, CD14⁺ AND DEFENSIN⁺ NEUTROPHILS IN THE BLOOD OF PATIENTS

Показатели/контроль, здоровые взрослые Indicators/control level, healthy adults	Группы пациентов Patient groups	До инъекции Before injection	Через 7 суток After 7 days	Через 14 суток After 14 days	P _{1,2}	P _{1,3}
		1	2	3		
CD117⁺, 0,13±0,10 × 10⁹/л CD117 ⁺ , 0.13±0.10 × 10 ⁹ /l	I	0,46±0,05	0,81±0,07	0,46±0,05	0,001 1,000	0,888 0,640
	II	0,44±0,08 p = 0,833	0,44±0,07 p = 0,001	0,39±0,07 p = 0,421		
CD34⁺ мононуклеары, 0,17±0,12 × 10⁹/л CD34 ⁺ mononuclear cells, 0.17±0.12 × 10 ⁹ /l	I	0,57±0,04	0,83±0,07	0,64±0,05	0,003 0,049	0,280 0,070
	II	0,46±0,04 p = 0,058	0,65±0,05 p = 0,042	0,61±0,07 p = 0,729		
Моноциты CD14⁺, 0,03±0,01 × 10⁹/л Monocytes CD14 ⁺ , 0.03±0.01 × 10 ⁹ /l	I	0,29±0,03	0,44±0,04	0,38±0,03	0,041 0,045	0,209 0,490
	II	0,27±0,02 p = 0,615	0,40±0,03 p = 0,712	0,24±0,02 p = 0,041		
Гранулоциты CD14⁺, 1,88±0,20 × 10⁹/л Granulocytes CD14 ⁺ , 1.88±0.20 × 10 ⁹ /l	I	4,5±0,3	3,4±0,2	2,3±0,2	0,029 0,308	0,000 0,061
	II	4,3±0,4 p = 0,826	3,6±0,3 p = 0,554	2,9±0,4 p = 0,348		
CD HLA-DR⁺, 0,92±0,25 × 10⁹/л CD HLA-DR ⁺ 0.92±0.25 × 10 ⁹ /l	I	1,04±0,06	1,52±0,08	1,34±0,12	0,000 0,006	0,030 0,064
	II	0,85±0,06 p = 0,030	1,26±0,13 p = 0,096	1,04±0,08 p = 0,044		
Def⁺ нейтрофилы, 51,3±14,4% Def ⁺ neutrophils, 51.3±14.4%	I	40,3±2,6	43,4±2,9	42,0±2,4	0,725 0,428	0,037 0,165
	II	42,0±3,0 p = 0,382	38,1±3,0 p = 0,842	34,3±3,7 p = 0,044		

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ IL-6 И СРБ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 4. BLOOD IL-6 AND CRP IN PATIENTS

Показатели/контроль, здоровые взрослые Indicators/control level, healthy adults	Группы пациентов Patient groups	До инъекции Before injection	Через 7 суток After 7 days	Через 14 суток After 14 days	P _{1,2}	P _{1,3}
		1	2	3		
IL-6, 2,11±2,84 пг/мл 2.11±2.84 pg/ml	I	115±14	51±7	25±3	0,000 0,000	0,000 0,000
	II	134±14 p = 0,343	74±9 p = 0,049	29±5 p = 0,496		
СРБ, 1,16±0,66 мг/л CRP, 1.16±0.66 mg/l	I	69±6	82±13	21±4	0,369 0,890	0,000 0,000
	II	84±8 p = 0,141	82±12 p = 1,000	35±7 p = 0,090		

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 5. СОДЕРЖАНИЕ МОНОНУКЛЕАРОВ CD117⁺, CD34⁺ И Def⁺ НЕЙТРОФИЛОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМ ТЕЧЕНИЕМ ПОЛИТРАВМЫ

TABLE 5. THE CONTENT OF MONONUCLEAR CELLS CD117⁺, CD34⁺ AND Def⁺ NEUTROPHILS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH DIFFERENT COURSE OF POLYTRAUMA

Показатели/ контроль, здоровые взрослые Indicators/control level, healthy adults	а) с осложнениями б) без осложнений a) with complications b) without complications	Группы пациентов Patient groups	До инъекции Before injection	Через 7 суток After 7 days	Через 14 суток After 14 days
CD117⁺, 0,13±0,10 × 10⁹/л CD117 ⁺ , 0.13±0.10 × 10 ⁹ /l	а) б)	I II	0,48+0,06 0,42+0,07 p = 0,522	0,81+0,09 0,21+0,13 p = 0,001	0,68+0,08 0,44+0,11 p = 0,607
		I II	0,49+0,06 0,40+0,05 p = 0,468	0,74+0,11 0,60+0,10 p = 0,356	0,55+0,07 0,42+0,07 p = 0,206
CD34⁺, 0,17±0,12 × 10⁹/л CD34 ⁺ , 0.17±0.12 × 10 ⁹ /l	а) б)	I II	0,48+0,06 0,46+0,07 p = 0,830	0,66+0,07 0,51+0,09 p = 0,278	0,66+0,08 0,41+0,10 p = 0,038
		I II	0,51+0,07 0,41+0,06 p = 0,289	0,82+0,07 0,64+0,06 p = 0,063	0,51+0,05 0,60+0,11 p = 0,467
Def⁺ нейтрофилы, 51,3±14,4% Def ⁺ neutrophils, 51.3±14.4%	а) б)	I II	32,7+4,3 38,3+6,8 p = 0,414	42,8+7,2 36,4+5,8 p = 0,488	45,4+5,8 32,24+5,5 p = 0,102
		I II	28,9+6,4 43,4+6,1 p = 0,120	31,8+5,2 38,1+8,3 p = 0,594	35,8+5,3 34,4+8,1 p = 0,722

Примечание. p – достоверность различий между одноименными подгруппами пациентов в основной группе и группе сравнения по U-критерию Манна–Уитни.

Note. p, the significance of the difference between the groups of patients of the main and comparison according to the Mann–Whitney U test.

мононуклеаров, а также по степени мобилизации из костного мозга в кровь Def⁺НГ. Антигены CD14 экспрессируются в составе Toll-подобных рецепторов 4 типа (Toll-like receptor 4, TLR4) на мембране моноцитов, макрофагов и НГ для раннего распознавания консервативных патоген-ассоциированных мембранных паттернов (ПАМП). Высокоспецифичное распознавание бактериальных антигенов и презентация их Т-лимфоцитам связаны с экспрессией антигенов МНС II класса – HLA-DR – макрофагами, моноцитами, В-лимфоцитами, дендритными клетками. Бактерицидная активность НГ в значительной степени определяется присутствием в лизосомах α-дефенсинов 1-3 типа (антимикробных пептидов), с помощью которых осуществля-

ется киллинг бактерий и вирусов [9]. Дефенсины выявляются в миелоидных клетках, начиная со стадии промиелоцита [4].

Перед первым введением препарата в обеих группах содержание CD14⁺ моноцитов в крови пострадавших в 9-10 раз превышало значение нормы (табл. 3). Через 7 дней количество этих клеток возрастало в обеих группах в 1,5 раза. На 14 сутки наблюдали достоверно более высокое содержание CD14⁺ моноцитов в группе I по сравнению с группой II. Содержание CD14⁺НГ плавно снижалось у пациентов обеих групп на протяжении 14 дней, но в большей степени у пациентов группы I. Количество антигенпрезентирующих HLA-DR⁺ мононуклеаров исходно не отличалось от уровня нормы в обеих группах.

ТАБЛИЦА 6. ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАТА НАТРИЯ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ АНЕМИИ, ГИПОПРОТЕИНЕМИИ И КОЛИЧЕСТВО ОСЛОЖНЕНИЙ

TABLE 6. EFFECT OF SODIUM DEOXYRIBONUCLEATE ON THE DURATION OF ANEMIA, HYPOPROTEINEMIA AND THE NUMBER OF COMPLICATIONS

Показатели/осложнения Indicators/complications	Подгруппа пациентов с осложнениями (а) Patients with complications (a)		p
	основной группы (Ia) of main groupe (Ia)	группы сравнения (IIa) of comparison groupe (IIa)	
Гемоглобин крови < 90 г/л, дни Blood hemoglobin < 90 g/l, days	3,2±1,3	7,9±2,1	0,044
Общий белок сыворотки < 60 г/л, дни Total proteins < 60 g/l, days	8,2±2,2	19,5±4,1	0,034
Количество осложнений у 1 пациента All complications in 1 patient	1,6±0,3	3,0±0,4	0,014
Количество инфекционных не угрожающих жизни осложнений у 1 пациента Non-life-threatening infectious in 1 patient	0±0	0,9±0,3	0,044

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

Через 7 дней количество этих клеток достоверно возрастало в обеих группах в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем. В группе I достигнутое повышение сохранялось и на 14-й день наблюдения в отличие от группы II, что свидетельствовало об активирующем влиянии препарата на антигенпрезентирующую функцию мононуклеаров.

Содержание в крови Def⁺НГ до введения препарата в обеих группах было в пределах референсных значений. В группе I наблюдали небольшой рост относительного содержания Def⁺НГ на протяжении 14 дней (табл. 3), в то время как у пациентов группы II доля этих клеток плавно снижалась в популяции гранулоцитов, достигая достоверного различия между группами к 14-му дню.

Итак, усиление миграции в кровь предшественников кроветворения (CD117⁺ и CD34⁺) под влиянием Дерината происходило к 7-му дню наблюдения. К 14-му дню возрастало количество клеток, отражающих состояние противинфекционной защиты, — CD14⁺ моноцитов, HLA-DR⁺ мононуклеаров, Def⁺НГ.

Введение препарата не сопровождалось усилением системного воспаления у обследованных пациентов (табл. 4). Высокие концентрации ИЛ-6 и СРБ, исходно отмеченные у пациентов обеих

групп, одинаково плавно снижались на протяжении 14 дней.

Для более детального изучения эффективности применения Дерината® в группах I и II были выделены подгруппы: а) с клинически значимыми осложнениями (инфекционными, неинфекционными, угрожающими жизни, не угрожающими жизни — 13 чел.) и б) без осложнений (14 чел.).

При сравнительном анализе содержания в крови предшественников кроветворения и клеток противинфекционной защиты (табл. 5) выявили более выраженный иммунокорректирующий эффект Дерината® у пациентов с осложнениями (подгруппы Ia и IIa). В подгруппе Ia наблюдали 1,7-кратное увеличение содержания CD117⁺ мононуклеаров к 7-м суткам после начала введения препарата в отличие от 2-кратного снижения содержания этих клеток у пациентов подгруппы IIa (p = 0,001). Содержание CD34⁺ мононуклеаров возрастало в подгруппе Ia в 1,4 раза к 14 дню и достоверно отличалось от аналогичного показателя в подгруппе IIa (p = 0,038). В подгруппах Ib и IIb не выявили достоверных различий в содержании CD117⁺ и CD34⁺ мононуклеаров в течение 14 дней.

Характерной особенностью пациентов с политравмой оказалось уменьшение доли НГ, содержащих антимикробные пептиды — дефенсины (Def⁺НГ). У пациентов подгрупп, получавших Деринат® (Ia и Ib), отметили тенденцию постоянного роста содержания этих клеток в течение 14 дней, причем более выраженное увеличение наблюдали в подгруппе Ia (с осложнениями). В подгруппах, получавших плацебо (Ib и IIb), процентное содержание Def⁺НГ постепенно снижалось на протяжении 14 дней (табл. 5).

Общеклиническая оценка применения Дерината в комплексной терапии пациентов с политравмой была следующей. Продолжительность стационарного лечения у пациентов группы I, получавших Деринат, оказалась меньше на 7 дней и составила 32,8 дня, в то время как в группе II с плацебо — 39,6 дня. Наибольший эффект препарата выявили в группах с осложнениями политравмы (табл. 6). У пациентов подгруппы Ia по сравнению с пациентами подгруппы IIa использование Дерината® способствовало достоверному уменьшению количества осложнений в 1,8 раза, причем преимущественно за счет инфекционных, не угрожающих жизни. Также отметили достоверное уменьшение продолжительности анемии и гипопроотеинемии у пациентов подгруппы Ia по сравнению с пациентами подгруппы IIa на 4,7 дня и 11,3 дня соответственно.

При введении препарата мы не наблюдали усиления местных и системных проявлений воспаления, а также каких-либо иных нежелательных эффектов.

Обсуждение

Обширные повреждения, в том числе и механические, являются причиной интенсивной миграции клеток из костного мозга, в том числе и стволовых, необходимых для восстановления тканей, усиления противоинфекционной защиты и формирования репаративных процессов. Уровень активации костномозгового кроветворения, репаративной активности и репопуляции гемопоэтических стволовых клеток можно оценивать по количеству циркулирующих в крови мононуклеаров, экспрессирующих рецептор фактора роста стволовых и тучных клеток CD117 (SCFR, тирозинкиназа Kit) и адгезионный рецептор стволовых клеток CD34 [19]. Количество циркулирующих в крови моноцитов и зрелых гранулоцитов и их способность к активации отражают компетентность костномозгового кроветворения при политравме.

Положительный результат применения нативных фрагментов ДНК у пострадавших с политравмой состоял в увеличении в крови количества мононуклеаров, экспрессирующих рецептор

фактора роста стволовых и тучных клеток CD117 и адгезионный рецептор стволовых клеток CD34 (табл. 3), что свидетельствовало об усилении миграции стволовых клеток в кровотоки. Максимум этого эффекта отмечался через 7 дней после начала введения препарата.

Известно, что у здоровых взрослых около половины НГ содержат в лизосомах антимикробные пептиды α -дефенсины 1-3 типа (Def⁺НГ), которые осуществляют лизис микроорганизмов внутри- и внеклеточно. При политравме скорость противоинфекционного «реагирования» фагоцитов приобретает особое значение в силу легкости проникновения инфекции через поврежденные покровные ткани и транслокации эндогенной микрофлоры со слизистых оболочек в кровь в условиях нарушенной гемодинамики и тканевой гипоксии [11]. У пациентов, получавших Деринат®, наблюдали достоверное увеличение относительного содержания в крови Def⁺НГ, в то время как у пациентов, получавших плацебо, этот показатель прогрессивно снижался (табл. 3).

Острая анемия и гипопроотеинемия являются закономерным следствием тяжелой травмы и массивной кровопотери. Применение Дерината® способствовало уменьшению длительности посттравматической анемии и гипопроотеинемии (табл. 6). Это крайне важно для устранения неблагоприятного действия тканевой и гемической гипоксии, улучшения белкового обмена, а также восстановления антимикробного потенциала крови и активизации репаративного процесса в тканях.

Результаты исследования продемонстрировали, что в условиях дополнительной активации костномозгового кроветворения у пострадавших с политравмой могут быть улучшены результаты лечения. У пациентов, пролеченных с применением Дерината®, количество выявленных осложнений оказалось в 1,8 раза меньше, чем у пациентов группы с плацебо.

Иммунорегулирующее действие Дерината® связано с наличием в нативных фрагментах ДНК метилированных и неметилированных CpG (цитозин-фосфат-гуанин) дезоксинуклеотидов. Оба вида CpG дезоксинуклеотидов способны оказывать активирующее влияние на реакции врожденного иммунитета. После проникновения внутрь клетки неметилированные CpG мотивы активируют экспрессию TLR-9 на мембранах эндосом моноцитов, макрофагов, В-лимфоцитов и дендритных клеток [15, 24]. Конститутивно этот рецептор экспрессируют только В-лимфоциты и плазмоцитоидные дендритные клетки (pDC) [12, 25]. Метилированные CpG дезоксинуклеотиды также способны вызывать активацию клеток иммунной системы, но при этом задействованы

другие сигнальные пути [20]. В силу сходства неметилированных CpG мотивов фрагментированной ДНК с ПАМП микроорганизмов они распознаются как антигены. В результате происходит активация внутриклеточных сигнальных путей, повышение антигенпрезентирующей способности клеток, усиление продукции микробицидных факторов и цитокинов. Активированные иммунокомпетентные клетки вызывают вторичную активацию клеточного и гуморального иммунитета, фагоцитоза, повышают продукцию гемопоэтинов. То есть все клетки иммунной системы могут активироваться после взаимодействия с CpG-ДНК: непосредственно или посредством костимуляции [18].

В экспериментальных условиях выявлена способность дезоксирибонуклеата натрия повышать уровень некоторых провоспалительных агентов. По данным Т.В. Русиновой [13], препарат усиливал продукцию ИЛ-8 и интерферона-альфа клетками крови здоровых людей и пациентов с острыми воспалительными заболеваниями носоглотки *in vitro*. В противоположность этому J. Liu и соавт. [23] наблюдали противовоспалительное действие Дерината® при применении его в виде аппликаций на область экспериментального пролежня, состоявшее в ингибировании альфа-рецептора ИЛ-6 в зоне пролежня.

В ходе настоящего исследования было установлено, что у пострадавших с политравмой ак-

тивация кроветворения и противоинфекционной защиты, достигнутая в результате введения Дерината®, не сопровождалась усилением системного воспаления (табл. 4).

Заключение

Введение нативных фрагментов дезоксирибонуклеата натрия пострадавшим с политравмой ежедневно с 1-го по 10-й дни после травмы активировало миграцию предшественников кроветворения из костного мозга в кровотоки и усиливало противоинфекционную защиту организма посредством увеличения количества нейтрофильных гранулоцитов, содержащих антимикробные пептиды – α -дефенсины 1-3 типа, и моноцитов, экспрессирующих антигены распознавания ЛПС (CD14⁺) и антигенпрезентирующие мембранные комплексы (CD HLA-DR⁺).

Корректирующее влияние дезоксирибонуклеата натрия в наибольшей степени проявилось у пациентов с осложнениями политравмы. Применение препарата способствовало уменьшению продолжительности и степени выраженности посттравматической гипопроотеинемии и анемии. Положительный клинический эффект дополнительного применения препарата в комплексном лечении пациентов состоял в сокращении срока госпитализации и уменьшении количества осложнений. При этом не наблюдалось усиления местных и системных проявлений воспаления.

Список литературы / References

1. Багненко С.Ф., Пивоварова Л.П., Осипова И.В., Малышев М.Е., Арискина О.Б. Состояние гранулоцитопоэза у пациентов с тяжелым сепсисом, развившимся после сочетанной механической травмы // *Инфекции в хирургии*, 2013. № 1. С. 44-48. [Bagnenko S.F., Pivovarova L.P., Osipova I.V., Malyshev M.E., Ariskina O.B. The state of granulocytopenia in patients with severe sepsis that developed after combined mechanical trauma. *Infeksii v khirurgii = Infections in Surgery*, 2013, no. 1, pp. 44-48. (In Russ.)]
2. Багненко С.Ф., Пивоварова Л.П., Осипова И.В., Малышев М.Е., Арискина О.Б. Посттравматическая анемия у пострадавших с тяжелой механической травмой // *Скорая медицинская помощь*, 2013. Т. 14, № 4. С. 41-46. [Bagnenko S.F., Pivovarova L.P., Osipova I.V., Malyshev M.E., Ariskina O.B. Post-traumatic anemia in patients with severe mechanical injury. *Skoraya meditsinskaya pomoshch = Emergency Medical Care*, 2013, Vol. 14, no. 4, pp. 41-46. (In Russ.)]
3. Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С. Действие дезоксирибонуклеиновой кислоты прокариот на гуморальные и клеточные факторы врожденного и адаптивного иммунитета позвоночных // *Тихоокеанский медицинский журнал*, 2009. № 3. С. 8-12. [Besednova N.N., Zaporozhets T.S. The effect of prokaryotes deoxyribonucleic acid on humoral and cellular factors of innate and adaptive vertebrate immunity. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2009, no. 3, pp. 8-12. (In Russ.)]
4. Будихина А.С., Пинегин Б.В. α -Дефенсины — антимикробные пептиды нейтрофилов: свойства и функции // *Иммунология*, 2008. № 5. С. 317-320. [Budikhina A.S., Pinegin B.V. α -Defensins – antimicrobial peptides of neutrophils: properties and functions. *Immunologiya = Immunology*, 2008, no. 5, pp. 317-320. (In Russ.)]
5. Громов М.И., Пивоварова Л.П. Применение иммуномодулятора деринат в лечении хирургических больных с тяжелым сепсисом // *Фундаментальные исследования*, 2012. № 7. С. 289-295. [Gromov M.I., Pivovarova L.P. The use of the immunomodulator derinat in the treatment of surgical patients with severe sepsis. *Fundamentalnyye issledovaniya = Fundamental Research*, 2012, no. 7, pp. 289-295. (In Russ.)]
6. Земсков А.М., Земсков В.М., Петров А.В., Никитин А.В. К механизму стимуляции иммуногенеза нуклеином натрия // *Иммунология*, 1981. № 1. С. 52-55. [Zemskov A.M., Zemskov V.M., Petrov A.V., Nikitin A.V.

To the mechanism of stimulation of immunogenesis by sodium nucleinate. *Immunologiya = Immunology*, 1981, no. 1, pp. 52-55. (In Russ.)]

7. Ивченко Д.Р., Пивоварова Л.П., Тулупов А.Н. Иммунопрофилактика посттравматической эмпиемы плевры // Скорая медицинская помощь, 2004. Т. 5, № 3. С. 159-160. [Ivchenko D.R., Pivovarova L.P., Tulupov A.N. Immunoprophylaxis of post-traumatic pleural empyema. *Skoraya meditsinskaya pomoshch = Emergency Medical Care*, 2004, Vol. 5, no. 1, pp. 159-160. (In Russ.)]

8. Каплина Э.Н., Вайнберг Ю.П. Деринат – природный иммуномодулятор для детей и взрослых. Изд. 3-е, испр. и доп. М.: Научная книга, 2007. 240 с. [Kaplina E.N., Weinberg Yu.P. Derinat is a natural immunomodulator for children and adults. Ed. 3rd, fix and add.]. Moscow: Scientific Book, 2007. 240 p.

9. Кокряков В.Н., Ковальчук Л.В., Алешина Г.М., Шамова О.В. Катионные противомикробные пептиды как молекулярные факторы иммунитета: мультифункциональность // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии, 2006. № 2. С. 98-105. [Kokryakov V.N., Kovalchuk L.V., Aleshina G.M., Shamova O.V. Cationic antimicrobial peptides as molecular factors of immunity: multifunctionality. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology Epidemiology and Immunology*, 2006, no. 2, pp. 98-105. (In Russ.)]

10. Лебедев В.Ф., Гаврилин С.В., Киров М.Ю., Неймарк М.И., Левит А.Л., Малкова О.Г., Останин А.А., Черных Е.Р., Стрельцова Е.И., Конь Е.М., Николенко А.В., Лебедев М.Ф., Чернышкова М.В., Ващенко В.В., Рудь А.А. Результаты многоцентрового проспективного контролируемого исследования эффективности препарата рекомбинантного интерлейкина-2 человека (ронколейкина) в комплексной интенсивной терапии тяжелого сепсиса // Интенсивная терапия, 2007, № 3. С. 20-31. [Lebedev V.F., Gavrillin S.V., Kirov M.Yu., Neymark M.I., Levit A.L., Malkova O.G., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Streltsova E.I., Kon E.M., Nikolenko A.V., Lebedev M.F., Chernyshkova M.V., Vashchenkov V.V., Rud A.A. The results of a multicenter prospective controlled study of the effectiveness of the drug recombinant human interleukin-2 (roncoleukin) in the complex intensive care of severe sepsis. *Intensivnaya terapiya = Intensive Care*, 2007, no. 3, pp. 20-31. (In Russ.)]

11. Малышев М.Е., Садуаляев Д.Ш., Арискина О.Б., Попенко Л.Н. Бактериальная транслокация в системный кровоток у пострадавших с сочетанной травмой // Вестник Авиценны, 2012. Т. 53, № 4. С. 53-56. [Malyshev M.E., Sadulayev D.Sh., Ariskina O.B., Popenko L.N. Bacterial translocation into the systemic circulation in patients with combined trauma. *Vestnik Avicenny = Bulletin of Avicenna*, 2012. Vol. 53, no. 4, pp. 53-56. (In Russ.)]

12. Половинкина В.С., Марков Е.Ю. Структура и иммуноадьювантные свойства CpG-ДНК // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 6. С. 469-476. [Polovinkina V.S., Markov E.Yu. The structure and immunoadjuvant properties of CpG-DNA. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 6, pp. 469-476. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2010-6-469-476.

13. Русинова Т.В. Механизм влияния препаратов нуклеиновых кислот на продукцию провоспалительных цитокинов *in vitro* в норме и при инфекционном процессе // Современные проблемы науки и образования, 2016. № 3. С. 11-14. [Rusinova T.V. The mechanism of influence of nucleic acid preparations on the production of pro-inflammatory cytokines *in vitro* in the norm and in the infectious process. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2016, no. 3, pp. 11-14. (In Russ.)]

14. Селезнев С.А., Багненко С.Ф., Шапот Ю.Б., Курыгин А.А. Травматическая болезнь и ее осложнения. СПб.: Политехника, 2004. 414 с. [Seleznev S.A., Bagnenko S.F., Shapot Yu.B., Kurygin A.A. Traumatic disease and its complications]. St. Petersburg: Polytechnic, 2004. 414 p.

15. Филатов О.Ю., Кашаева О.В., Бугримов Д.Ю., Климович А.А. Морфофизиологические принципы иммунологического действия ДНК эукариот // Российский иммунологический журнал, 2013. Т. 7 (16), № 4. С. 385-390. [Filatov O.Yu., Kashaeva O.V., Bugrimov D.Yu., Klimovich A.A. Morphophysiological principles of the immunological action of eukaryotic DNA. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (16), no. 4, pp. 385-390. (In Russ.)]

16. Цибин Ю.Н. Многофакторная оценка тяжести травматического шока в клинике // Вестник хирургии им. И.И. Грекова, 1980. Т. 125, № 9. С. 62-67. [Tsibin Yu.N. A multivariate assessment of the severity of traumatic shock in a clinic. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Grekov's Bulletin of Surgery*, 1980, Vol. 125, no. 9, pp. 62-67. (In Russ.)]

17. Baker S.P., O'Neill B. The injury severity score: update. *J. Trauma*, 1976, Vol. 16, no. 11, pp. 882-885.

18. Ballas Z.K. Modulation of NK cell activity by CpG oligodeoxynucleotides. *Immunologic Research*, 2007, Vol. 39, no. 1-3, pp. 15-21.

19. Edling C.E., Hallberg B. c-Kit – a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, Vol. 39, no. 11, pp. 1995-1998.

20. Goerdts S., Orfanos C.E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity*, 1999, no. 10, pp. 137-142.

21. Goldfarb Y., Levi B., Sorski L., Frenkel D., Ben-Eliyahu S. CpG-C immunotherapeutic efficacy is jeopardized by ongoing exposure to stress: Potential implications for clinical use. *Brain Behav. Immun.*, 2011. Vol. 25, no. 1, pp. 67-76.
22. Lee M.L., Strand V. Intravenous immunoglobulins in clinical practice. Marcel Dekker. New York, Basel, Hong Kong, 1997. 509 p.
23. Liu J., Rybakina E.G., Korneva E.A., Noda M. Effects of Derinat on ischemia-reperfusion-induced pressure ulcer mouse model. *J. Pharmacol. Sci.*, 2018, Vol. 138, no. 2, pp. 123-130.
24. Schetter C., Vollmer J. Toll-like receptors involved in the response to microbial pathogens: development of agonists for Toll-like receptor 9. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.*, 2004, Vol. 7, no. 2, pp. 204-210.
25. Vollmer J., Krieg A.M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, Vol. 61, no. 3, pp. 195-204.
26. Vollmer J., Weeratna R.D., Jurk M., Samulowitz U., McCluskie M.J., Payette P., Davis H.L., Schetter C., Krieg A.M. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology*, 2004, Vol. 113, no. 2, pp. 212-223.

Авторы:

Пивоварова Л.П. — д.м.н., руководитель отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Громов М.И. — д.м.н., руководитель отдела эфферентной терапии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Тулупов А.Н. — д.м.н., профессор, руководитель отдела сочетанной травмы ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Лапшин В.Н. — д.м.н., профессор, руководитель отдела анестезиологии и реанимации ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Осипова И.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Арискина О.Б. — к.б.н., научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Никитин А.В. — врач отдела сочетанной травмы ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Мальшев М.Е. — д.б.н., заведующий городской лабораторией иммуногенетики и серодиагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Маркелова Е.В. — врач клинической лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Pivovarova L.P., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Laboratory Diagnostics, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Gromov M.I., PhD, MD (Medicine), Head, Effluent Therapy Department, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Tulupov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Combined Injury Department, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Lapshin V.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Anesthesiology and Resuscitation Department, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Osipova I.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Laboratory Diagnostics, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ariskina O.B., PhD (Biology), Research Associate, Department of Laboratory Diagnostics, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Nikitin A.V., Combined Trauma Physician, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Malyshev M.E., PhD, MD (Biology), Head, City Laboratory of Immunogenetics and Serodiagnosis, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Markelova E.V., Clinical Laboratory Diagnostics Doctor, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 25.12.2019

Отправлена на доработку 19.01.2020

Принята к печати 06.05.2020

Received 25.12.2019

Revision received 19.01.2020

Accepted 06.05.2020

ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ИМУНОФАНА НА АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ ПРИ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ЭКССУДАТИВНОГО СРЕДНЕГО ОТИТА У ДЕТЕЙ

**Кологривова Е.Н., Плешко Р.И., Щербик Н.В., Староха А.В.,
Чичинская Э.**

*ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Томск, Россия*

Резюме. Экссудативный средний отит в детском возрасте чаще всего формируется на фоне хронического воспаления в носоглотке, непосредственными участниками которого являются клетки фагоцитарного ряда. В работе представлены результаты оценки клинической и иммунологической эффективности интраназального использования препарата Имунофан в комплексной терапии экссудативного среднего отита. Проводилось динамическое наблюдение (до лечения, через 1 и 3 месяца после лечения) за состоянием таких параметров, как количественное содержание нейтрофилов и моноцитов в периферической крови и на мазках-отпечатках со слизистой носа, активность миелопероксидазы в циркулирующих нейтрофилах и содержание интерлейкина IL-8 и IL-18 в назальном смыве. Клинический статус оценивался с помощью балльной системы, субъективно отражающей состояние носоглотки и слуховой функции. Обследованы 43 ребенка в возрасте от 3 до 7 лет с экссудативным средним отитом, развившимся на фоне хронического аденоидита. Пациенты первой группы (22 ребенка) были пролечены с использованием только традиционных подходов (базисная терапия). Пациенты второй группы (21 ребенок) дополнительно к базисной терапии получали препарат Имунофан. Группу контроля составили 16 относительно здоровых детей. До начала лечения у детей с экссудативным средним отитом отмечалось, в сравнении со здоровыми, повышение относительного содержания моноцитов в крови, снижение активности миелопероксидазы и концентрации IL-8 и IL-18 в назальном смыве. Различия по выраженности клинических симптомов между группами больных отсутствовали. Базисная терапия не сопровождалась положительной динамикой в клинической картине заболевания. В крови сохранялся относительный моноцитоз и сниженная активность нейтрофильной миелопероксидазы; концентрация IL-8 и IL-18 в назальных смывах оставалась низкой. При интраназальном использовании Имунофана к третьему месяцу от начала лечения происходило восстановление численности циркулирующих моноцитов, отмечалось повышение активности миелопероксидазы в нейтрофилах и концентрации IL-8 и IL-18 в назальных смывах. Нормализация параметров, характеризующих систему фагоцитов, ассоциировалась, согласно балльной оценке, с клинической ремиссией заболевания. Наличие связи клинических данных с результатами, полученными в ходе лабораторного исследования, позволяет говорить о положительном действии препарата Имунофан в качестве средства, повышающего эффективность традиционной базисной терапии экссудативного среднего отита у детей.

Ключевые слова: интраназальная иммунотерапия, экссудативный средний отит, детский возраст, фагоциты, миелопероксидаза, цитокины

Адрес для переписки:

*Кологривова Елена Николаевна
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел.: 8 (913) 876-80-69.
E-mail: enkologrivova@mail.ru*

Address for correspondence:

*Kologrivova Elena N.
Siberian State Medical University
634050, Russian Federation, Tomsk, Moskovsky Tract, 2.
Phone: 7 (913) 876-80-69.
E-mail: enkologrivova@mail.ru*

Образец цитирования:

*Е.Н. Кологривова, Р.И. Плешко, Н.В. Щербик,
А.В. Староха, Э. Чичинская «Влияние интраназального
применения Имунофана на активность фагоцитов при
комплексной терапии экссудативного среднего отита
у детей» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22,
№ 4. С. 741-750. doi: 10.15789/1563-0625-EOI-1720*

© Кологривова Е.Н. и соавт., 2020

For citation:

*E.N. Kologrivova, R.I. Pleshko, N.V. Scherbik, A.V. Starokha,
E. Chichinskaya "Effects of intranasal Imunofan administration
upon phagocytic activity in treatment of exudative otitis media
in children", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 741-750.
doi: 10.15789/1563-0625-EOI-1720*

DOI: 10.15789/1563-0625-EOI-1720

EFFECTS OF INTRANASAL IMUNOFAN ADMINISTRATION UPON PHAGOCYTOTIC ACTIVITY IN TREATMENT OF EXUDATIVE OTITIS MEDIA IN CHILDREN

Kologrivova E.N., Pleshko R.I., Scherbik N.V., Starokha A.V., Chichinskas E.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Exudative otitis media in childhood is most often associated with chronic inflammation in the nasopharyngeal area, with immediate participation of phagocytic cells. Our paper presents the data on evaluation of clinical and immunological efficacy of intranasal Imunofan use included into complex therapy of exudative otitis media. Dynamic observation (before treatment, 1 and 3 months after treatment) of these parameters included regular evaluation of the neutrophil and monocyte amounts in peripheral blood and in smear imprints from nasal mucosa, determination of myeloperoxidase activity in circulating neutrophils, and the content of interleukin IL-8 and IL-18 in the nasal washouts. The clinical status was assessed using a scoring system, which subjectively reflected the state of the nasopharynx and auditory function. Forty-three children aged from 3 to 7 years with exudative otitis media associated with chronic adenoiditis were examined. Patients of the first group (22 children) were treated using only conventional approaches (basic therapy). The patients from the second group (21 children) received Imunofan in addition to the basic therapy. The control group consisted of 16 relatively healthy children. Before treatment of the children with exudative otitis media, an increase in the relative content of monocytes in their blood, a decreased activity of myeloperoxidase and lower concentration of IL-8 and IL-18 in the nasal wash was observed in comparison with healthy controls. No differences in severity of clinical symptoms were revealed between the groups of patients. Baseline therapy was not accompanied by positive dynamics in the clinical pattern of the disease. Relative monocytosis and reduced activity of neutrophilic myeloperoxidase persisted in peripheral blood; the concentration of IL-8 and IL-18 in the nasal washings remained low. Following intranasal use of Imunofan, the number of circulating monocytes was restored by the third month from the start of treatment, there was an increased activity of myeloperoxidase registered in blood neutrophils, as well as higher IL-8 and IL-18 concentrations in the nasal washings. Normalization of the phagocytosis-related parameters, according to this scoring, was associated with clinical remission of the disease. The revealed relationships between clinical data and the results obtained in the course of laboratory research suggest a positive effect of Imunofan as an agent that may enhance effectiveness of conventional basic therapy of otitis media in children.

Keywords: intranasal immunotherapy, exudative otitis media, childhood, phagocytes, myeloperoxidase, cytokines

Введение

Экссудативный средний отит (ЭСО) – воспалительное заболевание, характеризующееся накоплением экссудата различного характера в полости среднего уха. ЭСО считается основной причиной снижения слуха у детей в возрасте от 2 до 7 лет на территории Российской Федерации [1]. Развитию ЭСО обычно предшествуют воспалительные процессы в носоглотке. Носоглоточная миндалина, будучи иммунокомпетентным органом, при неэффективном воспалении может стать очагом инфекции с последующим формированием хронического аденоидита (ХА). Распространению хронического воспаления на территорию полости среднего уха способствует анатомическая близость глоточной миндалины и евстахиевых труб и ослабление врожденных и

адаптивных механизмов иммунной защиты [11, 17]. При инфекционно-воспалительных процессах ЛОР-органов иммунодефицитные состояния возникают, прежде всего, на местном уровне [13], следовательно, наиболее целесообразной при таких ситуациях является локальная иммунореакция в очаге воспаления.

В качестве иммуномодулятора нами был использован препарат Имунофан. Показано, что эффект Имунофана в комплексном лечении острых и хронических воспалительных заболеваний связан с влиянием на различные звенья иммунной системы, в том числе и на компоненты врожденного иммунитета (НК-клетки, интерферогенез, продукцию провоспалительных цитокинов) [4, 5, 6, 7]. Имеющиеся клинические и экспериментальные данные указывают на то, что

препарат эффективен в низких дозах, для него характерна высокая биодоступность. Препарат разрешен для местного использования, легко всасывается на уровне эпителия слизистой оболочки, выпускается в виде интраназального спрея, что теоретически допускает его воздействие через полость носа и носоглотку на слуховые трубы и барабанную полость.

Одним из важнейших компонентов и индикаторов любого воспалительного процесса являются клетки фагоцитарного ряда — нейтрофилы и макрофаги [14]. Нейтрофилы одними из первых начинают формировать зону воспаления, макрофаги поддерживают и завершают, переводя в фазу репарации [8]. От активности фагоцитирующих клеток во многом зависит исход воспаления, в том числе вероятность его хронизации и генерализации.

Целью настоящей работы была оценка эффективности лечения экссудативного среднего отита у детей с хроническим аденоидитом при местном использовании в комплексной терапии препарата Иммунофан и исследование его влияния на фагоцитарное звено системы иммунитета.

Материалы и методы

В работе представлены результаты комплексного клинико-лабораторного обследования 59 детей (24 девочки и 35 мальчиков) в возрасте от 3 до 7 лет (средний возраст: $4,9 \pm 1,3$), в том числе 16 относительно здоровых детей, составивших группу контроля. 43 пациентам был выставлен клинический диагноз «хронический аденоидит, ассоциированный с экссудативным средним отитом». Обследование и лечение всех участников исследования выполнялось на базе кафедры оториноларингологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России после получения положительного заключения локального этического комитета. Критерием включения в исследование было наличие гипертрофии носоглоточной миндалины 2-3 степеней, отсутствие отягощенного аллергологического анамнеза, отсутствие острых заболеваний ушей и верхних дыхательных путей, а также наличие информированного согласия родителей.

Все пациенты путем рандомизации были разделены на две клинические группы в зависимости от вида консервативной терапии. Первую группу составили 22 ребенка (средний возраст $4,5 \pm 1,3$ лет), лечение которых проводилось с использованием только традиционного подхода (базисная терапия). Консервативное базисное лечение включало использование антигистаминных, муколитических, сосудосуживающих средств, механотерапию (продувание слуховых труб по Политцеру, пневмомассаж барабанных перепонок),

лазерную терапию в полость носа и эндауральный электрофонофорез с 3% раствором калия йодида. Вторая группа (базисная терапия + Иммунофан) включала 21 ребенка (средний возраст $4,8 \pm 1,4$ лет), которые дополнительно к базисной терапии получали Иммунофан, согласно разработанной нами схеме: интраназальный спрей вводился 7 дней по 1 дозе (50 мкг) в каждую половину носа два раза в день, затем по 1 дозе (50 мкг) в каждую половину носа 1 раз в день (перед сном) в течение 14 дней и далее снова по 1 дозе (50 мкг) 2 раза в день ежедневно в течение 7 дней (патент на изобретение № 2550966-2015).

Материалами исследования служили мазок периферической крови, взятой утром натощак из пальца, мазок-отпечаток со слизистой носа и назальный смыв. Взятие материалов и их исследование у больных детей проводилось трижды: при первичном обращении, через 1 и 3 месяца от начала лечения.

Мазки периферической крови готовились по стандартной методике и в дальнейшем использовались для подсчета лейкограммы и оценки активности миелопероксидазы (МП) в нейтрофилах.

Мазок-отпечаток со слизистой носа использовался для оценки клеточного состава ринограммы. В каждый носовой ход вводили ватный тупфер, поворачивая его несколько раз вокруг своей оси и касаясь стенок носовых ходов, после чего оставляли на 5-10 с. Далее после извлечения из ноздри вращательными движениями тупфером без надавливания проводили по обезжиренным предметным стеклам. Полученные мазки высушивали на воздухе, фиксировали в 70% этаноле 10-15 мин и окрашивали в течение 15 мин по методу Романовского—Гимзы. Подсчитывали процентное содержание эозинофилов, лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов.

Назальный смыв использовали для определения концентрации цитокинов, оказывающих существенное влияние на клетки фагоцитарного ряда: интерлейкина IL-8 и IL-18. Для получения смыва ватный тупфер, используемый для приготовления мазков-отпечатков со слизистой носа, помещали в пробирку с 2,0 мл физиологического раствора на 30 мин, затем после извлечения тупфера содержимое пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость хранили при температуре -72°C . Определение концентрации IL-8 и IL-18 проводилось с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов «IL-8-ИФА-Бест» и «IL-18-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия). Оптическую плотность измеряли на автоматическом иммуноферментном анализаторе.

ре (АИФР-01, ЗАО «ПИКОН», Россия). После измерения величины оптической плотности на основании калибровочного графика определяли концентрацию цитокинов в анализируемых образцах.

Активность миелопероксидазы в нейтрофильных гранулоцитах оценивали на мазках крови, окрашенных по методу Грэхема–Кнолля. Результаты учитывали полуколичественным методом с использованием принципа Астальди и представляли в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК) по L.S. Karlow (1955) [9].

Во время проведения клинического осмотра родителям предлагалось заполнить анкету, отражающую субъективную оценку общего состояния ребенка. Анкета состояла из 10 вопросов, разбитых на две группы: первые 5 вопросов включали оценку выраженности симптомов со стороны носоглотки (затруднение носового дыхания, храп во сне, кашель, выделения из носа, гнусавость), следующие 5 – оценку состояния слуховой функции (снижение слуха, шум в ушах, неправильное выговаривание слов, дискомфорт в ушах, нарушение речи). Каждый из вопросов сопровождался пятью вариантами прогрессивных ответов, перечисленных в порядке нарастания выраженности симптома и оцененных в балльной системе: 1 балл – отсутствие симптома, 2 балла – симптом слабо выражен, 3 балла – симптом средне выражен, 4 балла – симптом выражен выше среднего, 5 баллов – симптом сильно выражен. Минимальная величина общего количества баллов – 10, что соответствует состоянию относительного здоровья; максимальный размер общего балла – 50, что соответствует выраженным нарушениям.

Для проведения статистической обработки фактического материала использовали пакет SPSS Statistica (версия 17.0 для Windows). Проводилась проверка на нормальность распределения количественных показателей с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для оценки значимости различий между группами применялись непараметрические критерии: дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса для оценки внутригрупповых различий и критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони для проведения попарного внутригруппового сравнения. Для оценки различия между двумя независимыми выборками применялся критерий Манна–Уитни. Оценка динамики исследуемых параметров проводилась с помощью критерия Вилкоксона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

Результаты

Основной задачей нашего исследования была оценка динамики состояния фагоцитарного зве-

на иммунной системы при использовании Имунофана в комплексной терапии ЭСО. До начала лечения относительное содержание моноцитов в крови больных детей превышало показатель здоровых в среднем на 75%. На фоне применения Имунофана в динамике наблюдения регистрировалось постепенное увеличение содержания сегментоядерных нейтрофилов и уменьшение числа моноцитов, достигшего нормальных значений к третьему месяцу от начала лечения (табл. 1). В группе с базисной терапией относительный моноцитоз сохранялся в течение всего периода наблюдения.

Значимых различий в клеточном составе мазков-отпечатков со слизистой носа у больных до начала лечения и у здоровых детей выявлено не было (табл. 2). Применение Имунофана приводило к уменьшению на слизистой оболочке носа числа лимфоцитов и повышению содержания нейтрофилов, в то время как проведение базисного лечения не сопровождалось значимыми изменениями в течение всего периода наблюдения.

На фоне применения Имунофана происходило восстановление активности миелопероксидазы в нейтрофилах крови до значений, соответствующих здоровым детям, тогда как в группе базисной терапии активность миелопероксидазы в нейтрофилах оставалась пониженной на всех этапах наблюдения (табл. 3).

Содержание IL-8 и IL-18 в назальном смыве больных детей до начала лечения было почти в два раза ниже, чем в группе здоровых (табл. 4, 5).

На фоне применения Имунофана происходило увеличение концентрации IL-8 и IL-18 с достижением значений, соответствующих здоровым, тогда как в группе, получающей базисную терапию, концентрация этих цитокинов оставалась низкой в течение всего периода наблюдения.

Анализ данных анкетирования показал, что в ходе всего периода наблюдения у детей с ЭСО суммарный балл, отображавший субъективную степень выраженности симптомов со стороны носоглотки и слуховой функции, более чем в два раза превышал аналогичный показатель у здоровых детей, что соответствовало явной симптоматике заболевания (табл. 6).

До лечения различия по выраженности симптомов между исследуемыми клиническими группами отсутствовали. В ходе всего периода наблюдения в группе, получавшей базисную терапию, статистически значимых изменений со стороны выраженности симптомов выявлено не было. В группе детей, пролеченных с использованием Имунофана, уже к первому месяцу наблюдения выявлены значимые отличия: на фоне применения иммуномодулятора общий балл был значительно ниже, чем при базисной терапии ($p < 0,05$). Данное различие сохранялось и к тре-

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ЭКССУДАТИВНЫМ СРЕДНИМ ОТИТОМ, %, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. DYNAMICS OF LEUKOCYTE BLOOD COUNTS IN CHILDREN WITH EXUDATIVE OTITIS MEDIA, %, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Indicator	Здоровые Healthy n = 16	Базисная терапия Basic therapy n = 22			Базисная терапия + Иммунофан Basic therapy + Imunofan n = 21		
		До лечения Before treatment	Через 1 месяц In 1 month	Через 3 месяца In 3 months	До лечения Before treatment	Через 1 месяц In 1 month	Через 3 месяца In 3 months
Палочкоядерные нейтрофилы Band neutrophils	2 (1-3)	2 (0-4)	3 (1-4)	3 (2-4)	2 (1-3)	3 (2-4)	1** (1-3)
Сегментоядерные нейтрофилы Segmented neutrophils	50 (43-57)	44 (33-55)	44 (36-52)	43 (32-48)	34* (25-41)	40 (34-51)	45# (36-57)
Эозинофилы Eosinophils	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-1)	1 (1-2)	1 (0-3)	1 (0-3)
Базофилы Basophils	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Моноциты Monocytes	7 (5-9)	10* (7-13)	10* (7-15)	10* (9-13)	15* (9-17)	12* (7-13)	8# (6-11)
Лимфоциты Lymphocytes	41 (32-46)	42 (32-48)	41 (32-50)	45 (30-52)	49 (32-54)	44 (37-50)	42 (32-52)

Примечание. Статистически значимое различие по сравнению с: * – контролем, ** – базисным лечением, # – показателем до лечения, p < 0,05.

Note. Statistically significant difference compared to: *, control; **, basic treatment; #, pre-treatment index; p < 0.05.

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОГРАММЫ МАЗКОВ-ОТПЕЧАТКОВ СО СЛИЗИСТОЙ НОСА У ДЕТЕЙ С ЭКССУДАТИВНЫМ СРЕДНИМ ОТИТОМ, %, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. DYNAMICS OF CYTOGRAM INDICATORS OF SMEAR PRINTS FROM THE NASAL MUCOSA IN CHILDREN WITH EXUDATIVE OTITIS MEDIA, %, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Indicator	Здоровые Healthy n = 16	Базисная терапия Basic therapy n = 22			Базисная терапия + Иммунофан Basic therapy + Imunofan n = 21		
		До лечения Before treatment	Через 1 месяц In 1 month	Через 3 месяца In 3 months	До лечения Before treatment	Через 1 месяц In 1 month	Через 3 месяца In 3 months
Нейтрофилы Neutrophils	62 (42-81)	81 (41-93)	64 (36-81)	75 (40-95)	75 (50-94)	87* ** (72-96)	96* ** (95-100)
Эозинофилы Eosinophils	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Макрофаги Macrophages	1 (0-2)	2 (0-4)	3 (0-4)	0 (0-1)	1 (0-4)	0 (0-2)	1 (0-1)
Лимфоциты Lymphocytes	38 (19-56)	15 (2-55)	28 (13-47)	23 (5-35)	20 (2-46)	13* (3-20)	4* ** (0-5)

Примечание. Статистически значимое различие по сравнению с: * – контролем, ** – базисным лечением, p < 0,05.

Note. Statistically significant difference compared to: *, control; **, baseline treatment; p < 0.05.

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ЭКССУДАТИВНЫМ СРЕДНИМ ОТИТОМ, СРЕДНИЙ ЦИТОХИМИЧЕСКИЙ КОЭФФИЦИЕНТ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. DYNAMICS OF NEUTROPHILIC MYELOPEROXIDASE ACTIVITY IN CHILDREN WITH EXUDATIVE OTITIS MEDIA, MEAN CYTOCHEMICAL COEFFICIENT, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Группы Groups	Сроки наблюдения Terms of observation		
	До лечения Before treatment	Через 1 месяц In 1 month	Через 3 месяца In 3 months
Здоровые Healthy n = 16	2,78 (2,52-2,90)		
Базисная терапия Basic therapy n = 22	1,85* (1,31-2,28)	2,02* (1,34-2,21)	1,90* (1,42-2,03)
Базисная терапия + Имунофан Basic therapy + Imunofan n = 21	1,90* (1,54-2,15)	2,20* (1,97-2,50)	2,82**### (2,76-2,95)

Примечание. Статистически значимое различие по сравнению с: * – контролем, ** – базисным лечением, # – показателем до лечения, ### – 1-м месяцем, p < 0,05.

Note. Statistically significant difference compared to: *, control; **, baseline treatment; #, pre-treatment index; ##, 1st month; p < 0.05.

ТАБЛИЦА 4. ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ IL-8 (пг/л) В НАЗАЛЬНОМ СМЫВЕ У ДЕТЕЙ С ЭКССУДАТИВНЫМ СРЕДНИМ ОТИТОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 4. DYNAMICS OF THE CONCENTRATION OF IL-8 (pg/l) IN NASAL WASH IN CHILDREN WITH EXUDATIVE OTITIS MEDIA, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Группы Groups	Сроки наблюдения Terms of observation		
	До лечения Before treatment	Через 1 месяц In 1 month	Через 3 месяца In 3 months
Здоровые Healthy n = 16	422,50 (399,50-497,50)		
Базисная терапия Basic therapy n = 22	268,45* (194,24-361,69)	192,33* (146,67-251,32)	245,62* (187,58-379,77)
Базисная терапия + Имунофан Basic therapy + Imunofan n = 21	187,58* (106,71-289,38)	268,45*** (238,00-437,00)	393,09** (218,98-521,53)

Примечание. Статистически значимое различие по сравнению с: * – контролем, ** – базисным лечением, # – показателем до лечения, p < 0,05.

Note. Statistically significant difference compared to: *, control; **, basic treatment; #, pre-treatment index; p < 0.05.

тремя месяцами наблюдения: 23 балла в группе с базисной терапией и 13 – в группе с Имунофаном (p < 0,05), что соответствовало формированию клинической ремиссии (табл. 6).

Обсуждение

В настоящее время наиболее эффективным и распространенным подходом к лечению ЭСО, формирующегося у детей на фоне ХА, считается хирургическое удаление аденоидов [1, 20].

Аденотомия, вследствие нарушения важной защитной функции глоточной миндалины, может приводить к таким негативным последствиям, как понижение сопротивляемости к различным возбудителям респираторных заболеваний и возникновение других патологий верхних дыхательных путей [20]. Кроме того, хирургическое вмешательство имеет широкий спектр противопоказаний, что обуславливает задержку лечения и, как следствие, усугубляет патологические из-

ТАБЛИЦА 5. ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ IL-18 (пг/л) В НАЗАЛЬНОМ СМЫВЕ У ДЕТЕЙ С ЭКССУДАТИВНЫМ СРЕДНИМ ОТИТОМ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 5. DYNAMICS OF THE CONCENTRATION OF IL-18 (pg/l) IN NASAL WASHOUT IN CHILDREN WITH EXUDATIVE OTITIS MEDIA, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Группы Groups	Сроки наблюдения Terms of observation		
	До лечения Before treatment	Через 1 месяц In 1 month	Через 3 месяца In 3 months
Здоровые Healthy n = 16	95,50 (85,00-222,50)		
Базисная терапия Basic therapy n = 22	74,39* (53,00-100,30)	47,89* (37,70-78,47)	72,35* (47,89-115,16)
Базисная терапия + Иммунофан Basic therapy + Immunofan n = 21	55,03* (28,53-77,45)	44,83* (36,64-64,20)	77,45 (28,53-130,45)

Примечание. * – статистически значимое различие по сравнению с контролем, p < 0,05.

Note. *, statistically significant difference compared with the control, p < 0.05.

ТАБЛИЦА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ АНКЕТИРОВАНИЯ ДЕТЕЙ С ЭКССУДАТИВНЫМ СРЕДНИМ ОТИТОМ, БАЛЛЫ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 6. RESULTS OF THE SURVEY OF CHILDREN WITH EXUDATIVE OTITIS MEDIA, POINTS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Indicator	Здоровые Healthy n = 16	Базисная терапия Basic therapy n = 22			Базисная терапия + Иммунофан Basic therapy + Immunofan n = 21		
		До лечения Before treatment	Через 1 месяц In 1 month	Через 3 месяца In 3 months	До лечения Before treatment	Через 1 месяц In 1 month	Через 3 месяца In 3 months
Суммарный балл по симптомам со стороны носоглотки Total score for nasopharyngeal symptoms	5	15* (12-17)	13* (12-17)	14* (12-16)	15* (12-18)	9*** (7-10)	7*** (6-10)
Суммарный балл по оценке слуховой функции Total auditory score	5	13* (10-15)	11* (9-12)	12* (9-15)	11* (9-13)	7*** (6-8)	6*** (5-6)
Общий балл Overall score	10	27* (23-30)	25* (19-28)	23* (20-29)	26* (23-30)	16*** (14-19)	13*** (11-16)

Примечание. См. примечание к таблице 3.

Note. As for Table 3.

менения в носоглотке и в полости среднего уха. Консервативная терапия, способствующая восстановлению локальных и системных иммунных реакций, является альтернативным подходом, способствующим сохранению естественных механизмов иммунной защиты.

Оценивая показатели, характеризующие фагоцитарное звено иммунной системы, мы отметили, что до начала лечения количество моноцитов у больных детей превышало нормальные значения. Аналогичные результаты были получены и в проведенных ранее исследованиях [16]. Моноци-

тоз обычно сопровождается хроническое воспаление [12] и отражает усиление миграции из костномозгового пула, обусловленное повышением продукции хемокинов в очаге воспаления [14]. Однако ускоренный выход клеток в циркуляцию может нарушить процессы их костномозговой дифференцировки. Иммуногистохимическое исследование биоптатов глоточных миндалин показало, что у детей с ЭСО увеличено содержание интрафолликулярных CD68-экспрессирующих клеток (клетки моноцитарного ряда), но вместе с этим уменьшено число клеток, соответствующих по размерам зрелым макрофагам, в том числе с признаками фагоцитарной активности [11].

При использовании Имунофана к 3-му месяцу от начала лечения происходила нормализация относительного содержания моноцитов в крови. Терапия с применением иммуномодулятора приводила также к увеличению содержания нейтрофилов в мазках-отпечатках со слизистой носа, что можно интерпретировать как еще один положительный эффект. Выход нейтрофилов на поверхность слизистых оболочек считается физиологическим процессом, обеспечивающим ее защитные свойства [18]. В ряде случаев в ходе воспалительных процессов трансэпителиальная миграция нейтрофилов нарушается, что сопровождается накоплением последних в тканевом инфильтрате очага воспаления. Такое накопление может приводить к усилению деструкции тканей за счет цитолитического действия ферментов и кислородных радикалов, высвобождающихся из гибнущих клеток. Таким образом, можно предположить, что Имунофан благоприятно влияет на миелопоэз и на трансэпителиальную миграцию нейтрофилов.

Оценка микробицидной способности нейтрофилов нами проводилась на основании анализа активности МПО, значимо сниженной в обеих клинических группах до начала лечения. Согласно данным литературы, уменьшение активности МПО является отражением истощения функциональных резервов системы фагоцитов, обусловленным изменениями цитокинового баланса и продукции колониестимулирующих факторов [10]. Синтез МПО в нейтрофилах начинается на стадии миелобласта и полностью завершается на стадии промиелоцита, то есть накопление фермента происходит только в процессе дифференцировки, а поступающие в кровотоки клетки используют этот резерв при реализации своих функций [18]. В литературе встречаются данные о повышении концентрации IL-10 в крови детей с ЭСО, протекающем на фоне ХА [2, 19]. IL-10 – супрессорный цитокин, подавляющий активность моноцитов и макрофагов напрямую через соответствующий рецептор, и

опосредованно через угнетение синтеза IL-18 и колониестимулирующих факторов (GM-CSF и G-CSF) [3]. Последние отвечают за стимуляцию роста и дифференцировку гранулоцитов, а также являются дополнительным сигналом для инициации синтеза МПО [21]. Это нашло подтверждение в наших исследованиях в виде резко сниженной активности МПО в нейтрофилах, что могло стать основой нарушения местного иммунитета слизистых оболочек.

В литературе мы не встретили сведений, свидетельствующих об уменьшении чувствительности фагоцитов к цитокинам в условиях хронического воспаления, однако выявленные нами особенности локальной продукции IL-8 и IL-18 могут указывать на наличие нарушений в других звеньях иммунитета, влияющих на созревание и функционирование этих клеток. По результатам настоящей работы у детей с ЭСО, ассоциированным с ХА, до лечения выявлено низкое содержание IL-8 в назальном смыве, что совпадает с наблюдениями других авторов [7]. IL-8 – один из важнейших хемокинов, привлекающих нейтрофилы в очаг воспаления. Недостаток локально продуцируемого цитокина может приводить к нарушению миграционных процессов в системе фагоцитов и усугублять иммунные нарушения. Кроме того, нами выявлено низкое содержание IL-18 в назальном смыве у детей с осложненным течением ХА. Одна из основных функций IL-18 – индукция секреции γ -интерферона, который регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток моноцитарного ряда.

В динамике наблюдения за детьми, получавшими Имунофан, происходило повышение концентрации продукции IL-8 и IL-18 в назальном смыве и уменьшение содержания циркулирующих в крови моноцитов до нормальных значений. Снижение концентрации этих цитокинов наблюдали и при использовании данного препарата для лечения ХА, не осложненного ЭСО [7]. С учетом широкого спектра функциональной активности IL-8 и IL-18, особенно в отношении системы врожденного иммунитета, можно предположить, что восстановление параметров, характеризующих работу фагоцитарного звена, связано с применением Имунофана.

Оценка данных, полученных в ходе анкетирования, выявила значимые изменения, свидетельствующие о клиническом улучшении только в группе детей, получающих в составе комплексной консервативной терапии иммуномодулирующий препарат, причем положительный клинический эффект при местном применении Имунофана отмечался уже к концу первого месяца от начала лечения.

Заключение

Интраназальное использование Имунофана в составе комплексной терапии экссудативного среднего отита способствует восстановлению численности циркулирующих моноцитов, повышению активности миелопероксидазы в нейтрофилах и концентрации IL-8 и IL-18 в назальных смывах. Нормализация параметров, характеризующих систему фагоцитов, ассоциируется с клинической ремиссией заболевания. Наличие связи клинических данных с результатами, полученными в ходе лабораторного исследования, позволяет говорить о положительном действии препарата Имунофан на состояние ринофарингеальной зоны и усилении на его фоне эффективности традиционной базисной терапии экссудативного среднего отита у детей.

ющих систему фагоцитов, ассоциируется с клинической ремиссией заболевания. Наличие связи клинических данных с результатами, полученными в ходе лабораторного исследования, позволяет говорить о положительном действии препарата Имунофан на состояние ринофарингеальной зоны и усилении на его фоне эффективности традиционной базисной терапии экссудативного среднего отита у детей.

Список литературы / References

1. Болезни уха, горла, носа в детском возрасте: национальное руководство / под ред. М.Р. Богомилского, В.Р. Чистяковой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 736 с. [Diseases of the ear, throat, nose in childhood: national leadership / Ed. M.R. Bogomilsky, V.R. Chistyakova]. Moscow: GEOTAR-Media, 2008. 736 p.
2. Зорина В.Н., Климова И.И., Баженов Д.В., Зорина Р.М., Дружинина Ю.Г., Зорин Н.А. Особенности иммунного ответа при патологии глоточной миндалины // Иммунология, 2011. № 3. С. 163-165. [Zorina V.N., Klimova I.I., Bazhenov D.V., Zorina R.M., Druzhinina Yu.G., Zorin N.A. Features of the immune response in the pathology of the pharyngeal tonsil. *Immunologiya = Immunology*, 2011, no. 3, pp. 163-165. (In Russ.)]
3. Кадагидзе З.Г. Цитокины // Практическая онкология, 2003. Т. 4, № 3. С. 131-138. [Kadagidze Z.G. Cytokines. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*, 2003, Vol. 4, no. 3, pp. 131-138. (In Russ.)]
4. Караулов А.В. Клинико-иммунологическая эффективность применения имунофана при оппортунистических инфекциях // Лечащий врач, 2000. № 5-6. С. 28-29. [Karaulov A.V. Clinical and immunological efficacy of immunofan for opportunistic infections. *Lechashchiy vrach = Attending Physician*, 2000, no. 5-6, pp. 28-29. (In Russ.)]
5. Караулов А.В., Сокуренок С.И. Имунофан: непосредственные и отдаленные результаты лечения больных хроническим бронхитом // Медикал Маркет, 2000. № 34. С. 21-24. [Karaulov A.V., Sokurenko S.I. Imunofan: immediate and long-term results of treatment of patients with chronic bronchitis. *Medikal Market = Medical Market*, 2000, no. 34, pp. 21-24. (In Russ.)]
6. Кузнецова Р.Н., Сысоев К.А., Лебедев В.В., Тутельян А.В., Тотолян А.А. Особенности изменений местного иммунитета у больных с хроническим аденоидитом и возможности их коррекции препаратом Имунофан // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 6. С. 551-562. [Kuznetsova R.N., Sysoev K.A., Lebedev V.V., Tutelyan A.V., Totolyan A.A. Features of changes in local immunity in patients with chronic adenoiditis and the possibility of their correction with Imunofan. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 6, pp. 551-562. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-6-551-562.
7. Кузнецова Р.Н., Сысоев К.А., Лебедев В.В., Тутельян А.В., Тотолян А.А. Цитокины в носоглоточных смывах больных с хроническим аденоидитом в ходе монотерапии имунофаном // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 2-3. С. 261-268. [Kuznetsova R.N., Sysoev K.A., Lebedev V.V., Tutelyan A.V., Totolyan A.A. Cytokines in nasopharyngeal washes of patients with chronic adenoiditis during monotherapy with immunofan. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 2-3, pp. 261-268. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2008-2-3-261-268.
8. Маянский Д.Н. Лекции по клинической иммунологии: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 464 с. [Mayansky D.N. Lectures on clinical immunology: a guide for physicians]. Moscow: GEOTAR-Media, 2007. 464 p.
9. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. М.: Медицина, 1987. 368 с. [Menshikov V.V. Laboratory research methods in the clinic: a handbook]. Moscow: Medicine, 1987. 368 p.
10. Попов Н.Н., Огнивенко Е.В. Характер иммунных расстройств у лиц с ЛОР-патологией и способы их коррекции // Вестник ХНУ им. В.Н. Каразина. Серия «Медицина», 2010. № 19 (898). С. 88-96. [Popov N.N., Ognivenko E.V. The nature of immune disorders in persons with ENT pathology and methods for their correction. *Vestnik KhNU im. V.N. Karazina. Seriya "Meditsina" = Bulletin of V. Karazin Kharkiv National University. Medicine Series*, 2010, no. 19 (898), pp. 88-96. (In Russ.)]
11. Плешко Р.И., Староха А.В., Щербик Н.В., Кологривова Е.Н., Юнусов Р.Ш., Климов А.В., Федорова О.В. Морфофункциональные предпосылки развития экссудативного среднего отита у детей с хроническим аденоидитом // Вестник оториноларингологии, 2014. № 4. С. 39-41. [Pleshko R.I., Starokha A.V., Shcherbik N.V., Kologrivova E.N., Iunusov R.Sh., Klimov A.V., Fedorova O.V. The morphofunctional prerequisites for the development of exudative otitis media in the children presenting with chronic adenoiditis. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2014, no. 4, pp. 39-41. (In Russ.)]
12. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Жукова О.Б., Уразова О.И., Радзивил Т.Т., Кулагина И.В., Ковалева Н.П. Современные технологии лабораторной медицины: учебное пособие по клинической лабораторной диагностике для студентов медицинских вузов. Томск: Печатная мануфактура, 2008. 360 с. [Ryazantseva N.V.,

Novitsky V.V., Zhukova O.B., Urazova O.I., Radzivil T.T., Kulagina I.V., Kovaleva N.P. Modern technologies of laboratory medicine: Textbook]. Tomsk: Printed Manufactory, 2008. 360 p.

13. Саидов М.З., Джамалутдинов Ю.А., Асмаилова А.М., Нажфиутдинов И.И., Элькун Б.Б. Оценка клинической информативности взаимосвязей показателей системного и местного гуморального иммунитета у часто болеющих детей с патологией ЛОР-органов // Иммунология, 2007. Т. 28, № 3. С. 170-177. [Saidov M.Z., Jamalutdinov Yu.A., Asmailova A.M., Najfiutdinov I.I., Elkun B.B. Assessment of the clinical informativeness of the relationship of indicators of systemic and local humoral immunity in frequently ill children with ENT-organ pathology. *Immunologiya = Immunology*, 2007, Vol. 28, no. 3, pp. 170-177. (In Russ.)]

14. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. СПб.: Наука, 2000. 231 с. [Totolyan A.A., Freidlin I.S. Cells of the immune system]. St. Petersburg: Science, 2000. 231 p.

15. Щербик Н.В., Юнусов Р.Ш., Староха А.В., Плешко Р.И., Кологривова Е.Н., Литвак М.М., Чичинскас Э. Клинико-иммунологические проявления экссудативного среднего отита у детей на фоне иммунокоррекции // Омский научный вестник, 2014. Т. 134, № 2. С. 66-69. [Scherbik N.V., Yunusov R.Sh., Starokha A.V., Pleshko R.I., Kologrivova E.N., Litvak M.M., Chichinskask E. Clinical and immunological manifestations of otitis media with otitis media in children on the background of immunocorrection. *Omskiy nauchnyy vestnik = Omsk Scientific Bulletin*, 2014, Vol. 134, no. 2, pp. 66-69. (In Russ.)]

16. Юнусов Р.Ш., Плешко Р.И., Щербик Н.В., Кологривова Е.Н., Комарова С.В. Роль факторов врожденного иммунитета в развитии экссудативного среднего отита у детей с гипертрофией глоточной миндалины // Российский иммунологический журнал, 2013. Т. 7 (16), № 2-3. С. 269. [Yunusov R.Sh., Pleshko R.I., Scherbik N.V., Kologrivova E.N., Komarova S.V. The role of factors of innate immunity in the development of exudative otitis media in children with hypertrophy of the pharyngeal tonsil. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (16), no. 2-3, p. 269. (In Russ.)]

17. Lin K.M., Austin G.E. Functional activity of three distinct myeloperoxidase (MPO) promoters in human myeloid cells. *Leukemia*, 2002, Vol. 16, no. 6, pp. 1143-1153.

18. Persson C., Ulle L. Resolution of leucocyte-mediated mucosal diseases. A novel *in vivo* paradigm for drug development. *Br. J. Pharmacol.*, 2012, Vol. 165, no. 7, pp. 2100-2109.

19. Stol K., Diavatopoulos D.A., Graamans K., Engel A.M., Melchers J.G., Savelkoul F.J., Hays P., Warris M.D., Peter W.M. Inflammation in the middle ear of children with recurrent or chronic otitis media is associated with bacterial load. *Pediatr. Inf. Dis. J.*, 2012, Vol. 31, no. 11, pp. 1228-1234.

20. Türkoğlu Babakurban S., Aydın E. Adenoidectomy: current approaches and review of the literature. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg.*, 2016, , no. 26 (3), pp. 181-190.

21. Wang W., Wang X., Ward A.C., Touw I.P., and Friedman A.D. C/EBPalpha and G-CSF receptor signals cooperate to induce the myeloperoxidase and neutrophil elastase genes. *Leukemia*, 2001, Vol. 15, no. 5, pp. 779-786.

Авторы:

Кологривова Е.Н. — д.м.н., профессор, профессор кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Плешко Р.И. — д.м.н., профессор, профессор кафедры морфологии и общей патологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Щербик Н.В. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Староха А.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой оториноларингологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Чичинскас Э. — ординатор ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Authors:

Kologrivova E.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Pleshko R.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Scherbik N.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Starokha A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Otorhinolaryngology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Chichinskask E., Clinical Resident, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 05.02.2019

Отправлена на доработку 04.03.2019

Принята к печати 15.03.2019

Received 05.02.2019

Revision received 04.03.2019

Accepted 15.03.2019

ВЛИЯНИЕ ИММУНОЦИТОТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЖЕНЩИН С ИДИОПАТИЧЕСКИМ ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ

Кречетова Л.В., Вторушина В.В., Инвиева Е.В., Ванько Л.В., Николаева М.А., Тетруашвили Н.К.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Цель – изучение влияния иммуноцитотерапии на содержание в периферической крови пациенток с идиопатическим привычным выкидышем CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ клеток с естественной регуляторной активностью и активированных Th17-клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺, а также на продукцию *in vitro* цитокинов митоген-стимулированными клетками цельной периферической крови. Группу исследования составили 33 пациентки с ИПВ, забеременевшие после проведенной предгестационной аллоиммунизации. У 27 пациенток беременность пролонгирована до доношенного срока и завершилась рождением жизнеспособного ребенка, у 6 прервалась до 12 недель гестации. До назначения ИЦТ обследовано 19 пациенток, 16 – после аллоиммунизации вне беременности, 17 – в 5-6 и 8-9 недель наступившей беременности и 11 пациенток – в 12 недель. В контрольной группе обследовано 12 фертильных женщин вне беременности и 10 женщин в 12 недель физиологической беременности. Проводили оценку в периферической крови доли FoxP3⁺ и RORγt⁺ клеток среди Т-лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high} и определяли содержание цитокинов провоспалительной (IFNγ, TNFα, IL-1β, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12p70) и противовоспалительной (IL-4, IL-10) направленности, а также содержание IL-17. Нами было выявлено, что после предгестационной аллоиммунизации у женщин, потерявших данную беременность, был низкий уровень FoxP3⁺Treg, подавляющих провоспалительные Th17-зависимые реакции, без изменений в уровне активированных Th17-клеток (CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ лимфоцитов). При сроке 5-6 недель уровень CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ лимфоцитов был резко снижен по сравнению с уровнем вне беременности. Указанные факты в сочетании с данными о высокой продукции в сроке 5-6 недель IL-17 клетками периферической крови в культуре *in vitro* позволяют предположить, что после предгестационной аллоиммунизации у женщин с выкидышем формируется тенденция к провоспалительному типу продукции цитокинов, но в сроке 5-6 недель гестации она реализуется не в направлении Th1, а в направлении Th17-ответа, и низкий уровень в периферической крови клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ может отражать усиленную миграцию Th17-клеток из периферической крови в эндометрий матки. Таким образом, показано влияние иммуноцитотерапии на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и профиль цитокиновой продукции, а также на течение I триместра и исходы наступившей беременности у женщин с идиопатическим привычным выкидышем.

Ключевые слова: привычный выкидыш, иммуноцитотерапия, цитокины, FoxP3⁺, Treg, Th17

Адрес для переписки:

Инвиева Евгения Владимировна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»
117997, Россия, Москва, ул. Акад. Опарина, 4.
Тел.: 8 (495) 438-11-83.
E-mail: e_inviyeva@oparina4.ru

Address for correspondence:

Inviyeva Eeugenia V.
V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology
117997, Russian Federation, Moscow, Acad. Oparin str., 4.
Phone: 7 (495) 438-11-83.
E-mail: e_inviyeva@oparina4.ru

Образец цитирования:

Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, Е.В. Инвиева, Л.В. Ванько, М.А. Николаева, Н.К. Тетруашвили «Влияние иммуноцитотерапии на состояние иммунной системы женщин с идиопатическим привычным выкидышем» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 751-764. doi: 10.15789/1563-0625-EOI-1860

For citation:

L.V. Krechetova, V.V. Vtorushina, E.V. Inviyeva, M.A. Nikolaeva, L.V. Vanko, N.K. Tetrushvili "Effect of immunocytotherapy on the state of the immune system of women with idiopathic habitual miscarriage", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 751-764. doi: 10.15789/1563-0625-EOI-1860

EFFECT OF IMMUNOCYTOTHERAPY ON THE STATE OF THE IMMUNE SYSTEM OF WOMEN WITH IDIOPATHIC HABITUAL MISCARRIAGE

Krechetova L.V., Vtorushina V.V., Inviyaeva E.V., Nikolaeva M.A., Vanko L.V., Tetrushvili N.K.

V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Abstract. We aimed for assessing effects of immunocytotherapy upon the subpopulations of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ cells with natural regulatory activity and activated Th17 cells with the CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ phenotype, as well as *in vitro* production of cytokines in mitogen-stimulated cells from peripheral blood in the patients with idiopathic habitual miscarriage (IHM). The study group consisted of 33 patients with IHM who became pregnant after a pre-gestational alloimmunization. In 27 patients, the pregnancy was prolonged to the full term and ended with the birth of viable babies, in six cases it was terminated before 12 weeks of gestation. Before administration of immunocytotherapy (ICT), 19 patients were examined, of them 16 after alloimmunization outside of pregnancy, 17 at 5–6 and 8–9 weeks of pregnancy. Eleven patients were immunized at 12 weeks of pregnancy. In the control group, 12 fertile women outside pregnancy and 10 women at 12 weeks of physiological pregnancy were examined. The proportion of FoxP3⁺ and RORγt⁺ cells with the CD4⁺CD25^{high} phenotype was evaluated among T-lymphocytes from peripheral blood, as well as content of proinflammatory cytokines (IFNγ, TNFα, IL-1β, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12p70) and anti-inflammatory factors (IL-4, IL-10), as well as IL-17 amounts.

We have found that, following pre-gestational alloimmunization, the women who lost this pregnancy, had a low level of FoxP3⁺Tregs that suppress pro-inflammatory Th17-dependent reactions, however, without changing levels of activated Th17 cells (CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ lymphocytes). These facts, along with high *in vitro* production of IL-17 by peripheral blood cells at the terms of 5–6 weeks of gestation, suggest that, after pre-gestational alloimmunization in women with miscarriage, a predilection is formed to pro-inflammatory cytokine production. However, at the 5–6 week-period, it is realized not in the Th1 direction of, but towards Th17 response, and a low level of CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ cells may reflect an increased migration of Th17 cells from peripheral blood to the uterine endometrium.

Thus, we have shown the effect of immunocytotherapy upon subpopulational composition of peripheral blood lymphocytes and the cytokine profile, as well as upon the course of first trimester and outcomes of pregnancy in women with idiopathic habitual miscarriage.

Keywords: habitual miscarriage, immunocytotherapy, cytokines, FoxP3⁺, Treg, Th17

Статья выполнена в рамках темы Госзадания АААА-А18-118053190024-2.

Введение

Идиопатический привычный выкидыш (ИПВ) — акушерская патология, развитие которой с наибольшей вероятностью можно объяснить нарушением взаимоотношений иммунной системы матери и плода. Успешное применение иммунокорректирующей терапии для лечения привычной потери беременности ранних сроков свидетельствует в пользу данного предположения [1, 6, 9, 11, 14]. Наиболее дискуссионным видом иммунотерапии является иммунизация пациенток лимфоцитами партнера (клеточная иммунотерапия, аллоиммунизация, иммуноцитотерапия, ИЦТ).

Однозначного представления об эффективности ИЦТ в лечении привычного выкидыша нет. Отсутствие общепринятых протоколов подготовки клеток для иммунизации и процедуры иммунизации существенно затрудняет оценку эффективности аллоиммунизации и понимание механизмов ее действия [12, 15]. Долгое время ИЦТ рассматривалась как способ изменения провоспалительного состояния женской иммунной системы, способствующего отторжению плода, на противовоспалительное, то есть как способ изменения баланса иммунных реакций Th1/Th2 в сторону Th2-реакций. Так, сообщалось, что у пациенток с ИПВ вне беременности выше количество TNFα⁺Th1-клеток и выше соотношение TNFα/IL-10 Th1/Th2-продуцирующих клеток, что трактовалось как провоспалительное состояние иммунной системы [20, 33]. Показано, что

в супернатантах культур мононуклеарных клеток женщин с ИПВ, сокультивируемых с мононуклеарными клетками супругов, уровень TNF α выше, чем в контрольных пробах. После проведения иммунотерапии лимфоцитами супругов в таких же образцах пациенток с благополучной завершившейся беременностью уровень TNF α и IFN γ оказался значимо ниже, что авторами рассматривалось как благоприятное влияние иммунотерапии на баланс иммунных реакций [16, 31]. В работе Wilczy ski J.R. и соавт. не обнаружено различий в соотношении концентраций цитокинов Th1/Th2-типа у пациентов с ИПВ с доношенной и прервавшейся после иммунизации лимфоцитами супругов беременностью и отсутствовала корреляция с пролонгированием беременности и составом цитокинов периферической крови [28].

С открытием значимости для формирования антиген-специфической толерантности естественных Т-регуляторных клеток (FoxP3⁺Treg-клеток, Treg) высказано мнение, что иммунотерапия ИПВ должна иметь целью не супрессию материнской иммунной системы, а, скорее, повышение толерантности, что обусловлено данными об увеличении числа периферических Treg во время беременности и об отсутствии такой динамики у женщин с ИПВ [29]. Показано как увеличение количества Treg при аллоиммунизации [3], так и отсутствие изменений в их содержании [22]. Поэтому стали актуальными исследования взаимоотношений Treg с клетками Th17-линии у женщин с ИПВ на фоне клеточной иммунотерапии [32]. Анализ дифференцировки Treg и Th17-клеток показал их взаимное регулирование [10]. Транскрипционные факторы (ТФ) FoxP3 и ROR γ t совместно экспрессируются в стимулированных через Т-клеточный рецептор (ТКР, TCR) наивных CD4⁺Т-клетках в раннюю фазу их дифференцировки [18], и направление дифференцировки антиген-стимулированных Т-клеток по пути Th17 или Treg зависит от баланса ROR γ t и FoxP3, регулируемого цитокинами [8, 19, 35]. Баланс FoxP3⁺Treg-клеток с субпопуляцией Th17-клеток имеет важное значение для пролонгирования беременности. Есть данные о том, что ИЦТ приводит к снижению соотношения Th17/Treg в периферической крови женщин с ПВ, что считается благоприятным для поддержания развития гестационных процессов [24, 30].

Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и профиля цитокиновой продукции ими *in vitro* является важным для понимания механизмов влияния ИЦТ на состояние иммунной системы женщин с привычным выкидышем и представляет научный и практический интерес.

Целью данной работы явилось изучение влияния иммуноцитотерапии пациенток с идиопатическим привычным выкидышем на содержание естественных регуляторных клеток (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) и активированных Th17-клеток (CD4⁺CD25^{high}ROR γ t⁺) в периферической крови, а также на уровень продукции цитокинов *in vitro* митоген-стимулированными клетками цельной периферической крови.

Материалы и методы

Группу исследования составили 33 пациентки с ИПВ, забеременевшие после проведенной предгестационной аллоиммунизации. У 27 пациенток беременность пролонгирована до доношенного срока и завершилась рождением жизнеспособного ребенка, у 6 – прервалась до 12 недель гестации.

Процедуру ИЦТ проводили аллогенными клетками супругов в предгестационной подготовке и в первом триместре наступившей беременности. До проведения настоящего исследования пациентки ИЦТ не получали. Методика проведения ИЦТ утверждена на заседании Ученого совета ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 19 от 25 декабря 2012 г.).

Для проведения процедуры использовали лимфоциты, соответствующие критериям донорства. В процедурном кабинете осуществляли забор крови из локтевой вены в стерильную пробирку объемом 50 мл, в качестве антикоагулянта использовали 200 мкл раствора гепарина (исходный раствор 5000 МЕ/мл).

В специальном помещении, оснащеном ламинарным шкафом и необходимым лабораторным оборудованием, осуществляли выделение лимфоцитарной взвеси. После тщательного перемешивания кровь инкубировали при 37 °С в течение 1-1,5 часов. После разделения крови на 2 слоя (верхний – плазма с мононуклеарными клетками, нижний – эритроциты) верхний слой переносили в центрифужную стерильную пробирку объемом 14 мл и центрифугировали в течение 7 минут при 1500 об/мин.

После удаления супернатанта в пробирку вносили 6 мл стерильного физиологического раствора, наслаивали на 3 мл фикола в двух пробирках параллельно, сохраняя соотношение 1:2, и центрифугировали в течение 30 минут при 1500 об/мин. Лимфоцитарные кольца собирали в чистую стерильную пробирку, отмывали 2 раза 14 мл физиологического раствора в течение 7 минут при 1500 об/мин. После центрифугирования надосадов удаляли, осадок тщательно перемешивали в 2 мл стерильного физиологического раствора.

Путем визуального подсчета в камере Горяева в полученной взвеси определяли количество клеток. Концентрация лимфоцитов в физиологическом растворе составляла от 20 до 50 млн в 1 мл раствора.

Во время предгестационной подготовки лимфоциты супруга вводили в ладонную поверхность предплечья дважды с интервалом в один месяц на 5-10 день менструального цикла, внутрикожно в 10-12 точек, а во время наступившей беременности – в сроках 5-6 недель и 8-9 недель, согласно протоколу ведения беременности у пациенток с ПВ [7]. В течение недели производили визуальную оценку местной реакции организма на введение лимфоцитов партнеров.

Забор крови осуществляли натошак из локтевой вены. В предгестационной подготовке кровь забирали до иммунизации и после каждого введения клеток на 18-22 день менструального цикла, а у беременных – в сроке 5-6 недель (до иммунизации), в 8-9 недель (до иммунизации) и в 12 недель гестации.

До назначения ИЦТ обследовано 19 пациенток, 16 – после аллоиммунизации вне беременности, 17 – в 5-6 и 8-9 недель наступившей беременности и 11 пациенток – в 12 недель. В контрольной группе обследовано 12 фертильных женщин вне беременности и 10 женщин в 12 недель физиологической беременности.

Критерии включения в группу исследования: наличие не менее 2 выкидышей от одного и того же партнера, произошедших в первом триместре, возраст женщины от 20 до 40 лет, нормальный кариотип партнера, нормозооспермия партнера, самопроизвольное наступление беременностей, отсутствие анатомических, генетически обусловленных, аутоиммунных, гормональных нарушений, тяжелых экстрагенитальных заболеваний, подписание формы информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии включения в контрольную группу: наличие как минимум одних родов в анамнезе от данного партнера, возраст женщины от 20 до 40 лет, неотягощенный акушерский и гинекологический анамнез, отсутствие гормональных нарушений, сопровождающихся изменениями менструального цикла, нормальный кариотип партнеров, нормозооспермия, физиологическое течение данной беременности, подписанная форма информированного согласия на проведение исследования.

Кровь для анализа у женщин вне беременности забирали натошак из локтевой вены на 18-22 день менструального цикла, у беременных – в сроке 5-6 недель, в 8-9 недель и в 12 недель гестации.

Оценка содержания в периферической крови женщин с привычным выкидышем CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ клеток и CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ клеток

Оценку в периферической крови доли FoxP3⁺ и RORγt⁺ клеток среди Т-лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high} проводили с помощью стандартного набора буферов “FoxP3 Staining Buffer Set” (eBioscience, США). Лимфоциты выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности с использованием смеси фиколл-верографин плотностью 1,077 [5]. До пермеабиллизации клетки окрашивали антителами к CD4, меченными FITC, и антителами к CD25, меченными PE, для последующей идентификации субпопуляции CD4⁺CD25^{high}. После пермеабиллизации клетки были окрашены антителами к FoxP3 или RORγt, меченными аллофикоцианином (APC). Использовались антитела фирмы eBioscience (США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Gallios фирмы Beckman Coulter (США) с использованием программы Kaluza. В лимфоцитарном гейте копили от 1 млн до 1,5 млн клеток.

Продукция цитокинов *in vitro* митоген-стимулированными клетками периферической крови женщин с ИПВ

Для получения супернатантов после 24-часовой митогенной стимуляции клеток цельной крови использовали набор «Цитокин-стимул-бест» (АО «Вектор-Бест», Россия). В соответствии с рекомендацией производителя стимулировать 1 мл цельной крови осуществлялось в стерильном флаконе в CO₂-инкубаторе при 37 °С в течение 24-х часов. Смесь митогенов для стимулирования 1 мл цельной крови содержала 4 мкг ФГА, 4 мкг Кон А, 2 мкг липополисахарида. По окончании инкубации препараты крови центрифугировали в течение 10 минут при 3000 g, отбирали супернатант, вновь центрифугировали в течение 3-х минут при 10000 g, отобранную надосадочную жидкость алиquotировали и образцы хранили до анализа при -80 °С.

Содержание цитокинов провоспалительной (IFNγ, TNFα, IL-1β, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12p70) и противовоспалительной (IL-4, IL-10) направленности в супернатантах оценивали с помощью мультиплексного анализа с использованием стандартного набора “Human Th1/Th2 11-plex Ready-to-Use Kit” (eBioscience, США), содержание IL-17 оценивали методом СВА с помощью стандартного набора “Human IL-17A Flex set” (Becton Dickinson, США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Расчет результатов производили с помощью программы FlowCytomix Pro 3.0.

Статистическую обработку данных производили общепринятыми методами вариационной статистики. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего. Соответствие расчетных выборок показателей нормальному распределению оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова с использованием пакета Statistica 6 для Windows XP. Значимость наблюдаемых отклонений средних значений измеренных параметров оценивали с помощью двухвыборочного t-критерия Стьюдента с различными дисперсиями для средних значений с использованием пакета статистического анализа для Microsoft Office Excel 2007.

Результаты

Содержание в периферической крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ и $CD4^+CD25^{high}ROR\gamma^t$ клеток

Результаты анализа содержания $CD4^+CD25^{high}$ лимфоцитов с ТФ $FoxP3^+$ или $ROR\gamma^t$ у пациенток с ИПВ представлены на рисунке 1.

Согласно полученным данным (рис. 1А), доля $FoxP3^+$ -Трег среди $CD4^+CD25^{high}$ клеток в периферической крови женщин с беременностью была сходной в разные сроки обследования, не отличалась от доли у женщин контрольной группы вне беременности и в 12 недель гестации.

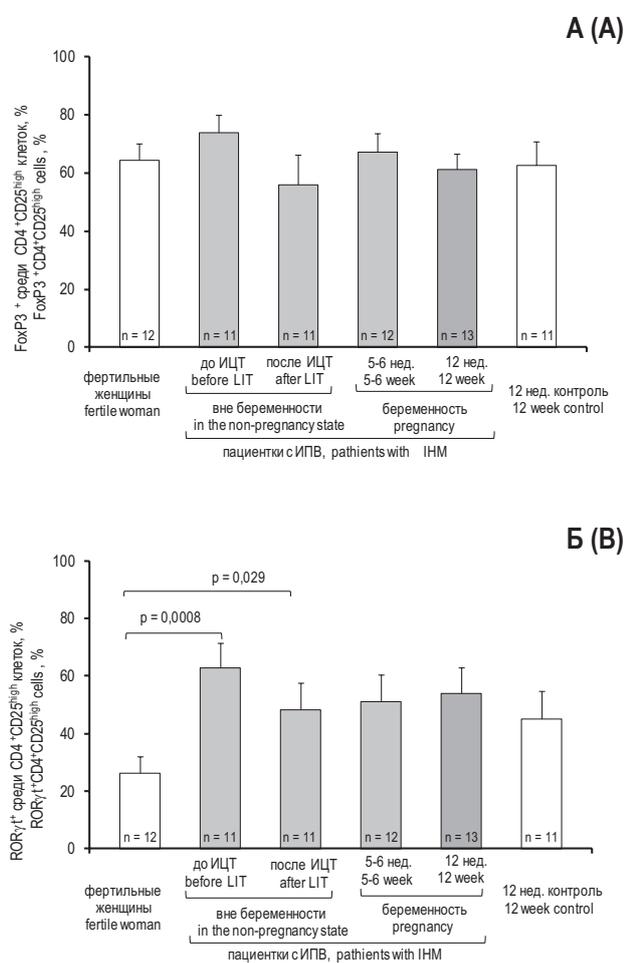


Рисунок 1. Доля $FoxP3^+$ (А) и $ROR\gamma^t+$ (Б) Т-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^{high}$ у пациенток с ИПВ после аллоиммунизации вне беременности и в I триместре пролонгированной беременности

Примечание. □ – контрольные группы, ■ – пациентки с ИПВ.

Figure 1. Proportion of $FoxP3^+$ (A) and $ROR\gamma^t+$ (B) T lymphocytes with the $CD4^+CD25^{high}$ phenotype in patients with IHM after allimmunization outside pregnancy and in the first trimester of a prolonged pregnancy

Note. □, control groups; ■, patients with IHM.

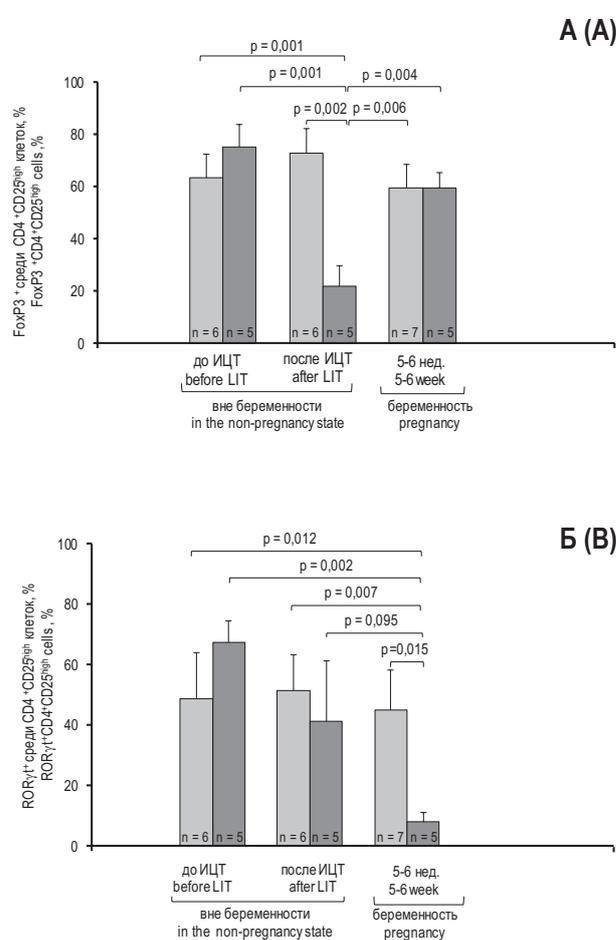


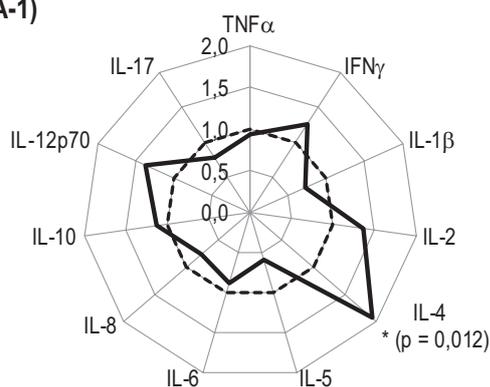
Рисунок 2. Доля $FoxP3^+$ (А) и $ROR\gamma^t+$ (Б) Т-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^{high}$ у пациенток с ИПВ с пролонгированной и прервавшейся беременностью

Примечание. ■ – с пролонгированной беременностью, ■ – с прервавшейся беременностью.

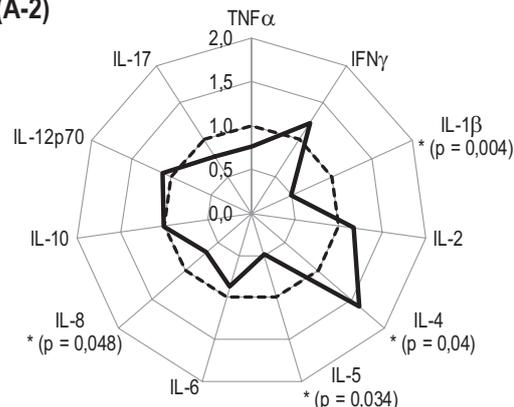
Figure 2. Proportion of $FoxP3^+$ (A) and $ROR\gamma^t+$ (B) T lymphocytes with the $CD4^+CD25^{high}$ phenotype in patients with IHM with prolonged and terminated pregnancy

Note. ■, with prolonged pregnancy; ■, with an aborted pregnancy.

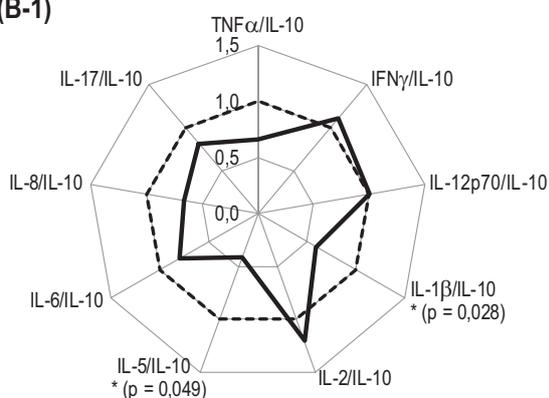
A-1 (A-1)



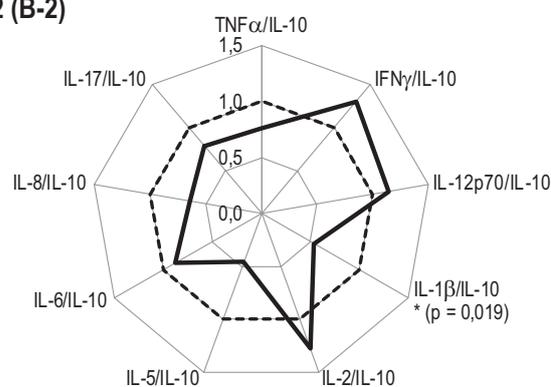
A-2 (A-2)



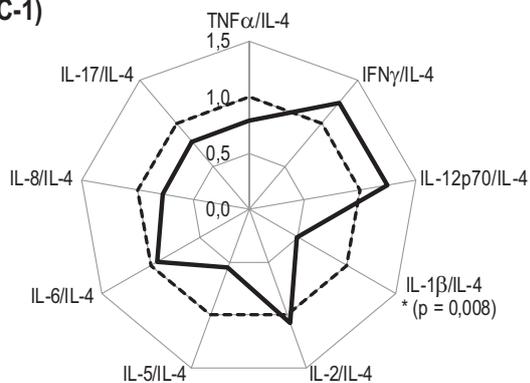
Б-1 (B-1)



Б-2 (B-2)



В-1 (C-1)



В-2 (C-2)

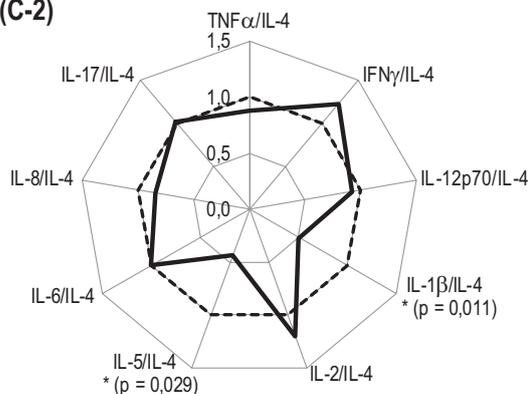


Рисунок 3. Характеристика продукции *in vitro* цитокинов клетками цельной крови женщин с ИПВ после аллоиммунизации вне беременности

Примечание. По осям представлены отношения средних значений показателей пациенток с ИПВ ($n = 19$) к средним значениям в контрольной группе ($n = 12$) до аллоиммунизации (1) и после аллоиммунизации (2). А – содержание цитокинов. Б – отношение содержания провоспалительных цитокинов к IL-10. В – отношение содержания провоспалительных цитокинов к IL-4. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * – показатель, достоверно отличающийся от значений в контрольной группе.

Figure 3. Characterization of *in vitro* production of cytokines by the whole blood cells of women with IHM after alloimmunization outside pregnancy

Note. The axes are the ratios of the average values of indicators of patients with IHM ($n = 19$) to the average values in the control group ($n = 12$) before alloimmunization (1) and after alloimmunization (2). A, cytokine content. B, the ratio of the content of pro-inflammatory cytokines to IL-10. C, the ratio of the content of pro-inflammatory cytokines to IL-4. The dashed line corresponds to the level of equality of values. *, indicator significantly different from the values in the control group.

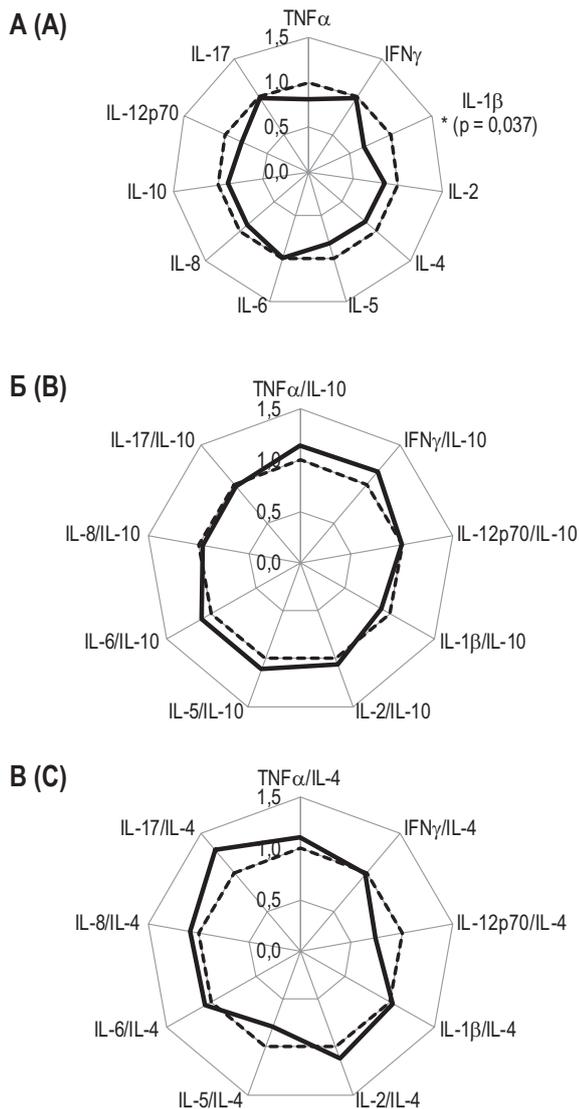


Рисунок 4. Характеристика продукции *in vitro* цитокинов клетками цельной крови женщин с ИПВ после предгестационной аллоиммунизации

Примечание. По осям представлены отношения средних значений показателей пациенток с ИПВ после предгестационной аллоиммунизации к исходным значениям (n = 19). А – содержание цитокинов. Б – отношение содержания провоспалительных цитокинов к IL-10. В – отношение содержания провоспалительных цитокинов к IL-4. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * – показатель, достоверно отличающийся от исходных значений.

Figure 4. Characterization of *in vitro* production of cytokines by whole blood cells of women with IHM after pregestational alloimmunization

Note. The axes represent the ratio of the average values of indicators of patients with IHM after pregestational alloimmunization to the initial values (n = 19). A, cytokine content. B, the ratio of the content of pro-inflammatory cytokines to IL-10. C, the ratio of the content of pro-inflammatory cytokines to IL-4. The dashed line corresponds to the level of equality of values. *, indicator significantly different from the original values.

Доля $ROR\gamma t^+$ клеток среди $CD4^+CD25^{high}$ клеток (рис. 1Б) до предгестационной аллоиммунизации была значимо выше, чем в контроле ($p = 0,0008$). По окончании предгестационной аллоиммунизации различия сохранились ($p = 0,029$), но в I триместре пролонгированной беременности отсутствовали.

Анализ динамики доли $FoxP3^+$ и $ROR\gamma t^+$ среди $CD4^+CD25^{high}$ клеток у пациенток с пролонгированной и прервавшейся беременностью представлен на рисунке 2.

Как следует из рисунка 2, у пациенток, потерявших беременность, после предгестационной аллоиммунизации наблюдалось транзитное снижение доли $FoxP3^+Treg$ (рис. 2А).

Доля $ROR\gamma t^+$ клеток среди $CD4^+CD25^{high}$ лимфоцитов у пациенток, потерявших данную беременность (рис. 2Б), в 5-6 недель гестации имела минимальные значения за весь период наблюдения.

Исследование цитокинового профиля супернатантов активированных *in vitro* лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ

Результаты анализа цитокиновой продукции клетками цельной крови до и после предгестационной аллоиммунизации пациенток в сравнении с контрольными и исходными значениями представлены на рисунке 3.

Как видно из данных на рисунке 3, до предгестационной аллоиммунизации продукция IL-4 митоген-стимулированными клетками цельной крови пациенток была высокой. Обнаружена тенденция к увеличенной продукции IL-2, который вырабатывается в ответ на митогенную стимуляцию не только Т-, но и В-лимфоцитами и сам стимулирует выработку как других провоспалительных цитокинов, так и IL-4. Одной из функций IL-4 является подавление секреции макрофагами IL-1 β , TNF α и IL-6, что подтверждается выявленными нами тенденциями к снижению продукции IL-1 β , IL-6. При этом соотношения IL-1 β /IL-4 и IL-1 β /IL-10 были значимо ниже, чем у женщин контрольной группы. Также значимо ниже, чем в контроле, оказалось соотношение IL-5/IL-10 при тенденции к снижению продукции IL-5 (цитокин из группы гранулоцитарно-макрофагальных колоннестимулирующих факторов) клетками крови пациенток.

Все вместе указанные различия можно рассматривать как проявление склонности к формированию у пациенток с ИПВ на этапе подготовки к беременности (до назначения аллоиммунизации) преимущественно Th2-направленности иммунных реакций.

После предгестационной аллоиммунизации у пациенток по сравнению с контрольной группой сохраняется увеличенной продукция IL-4

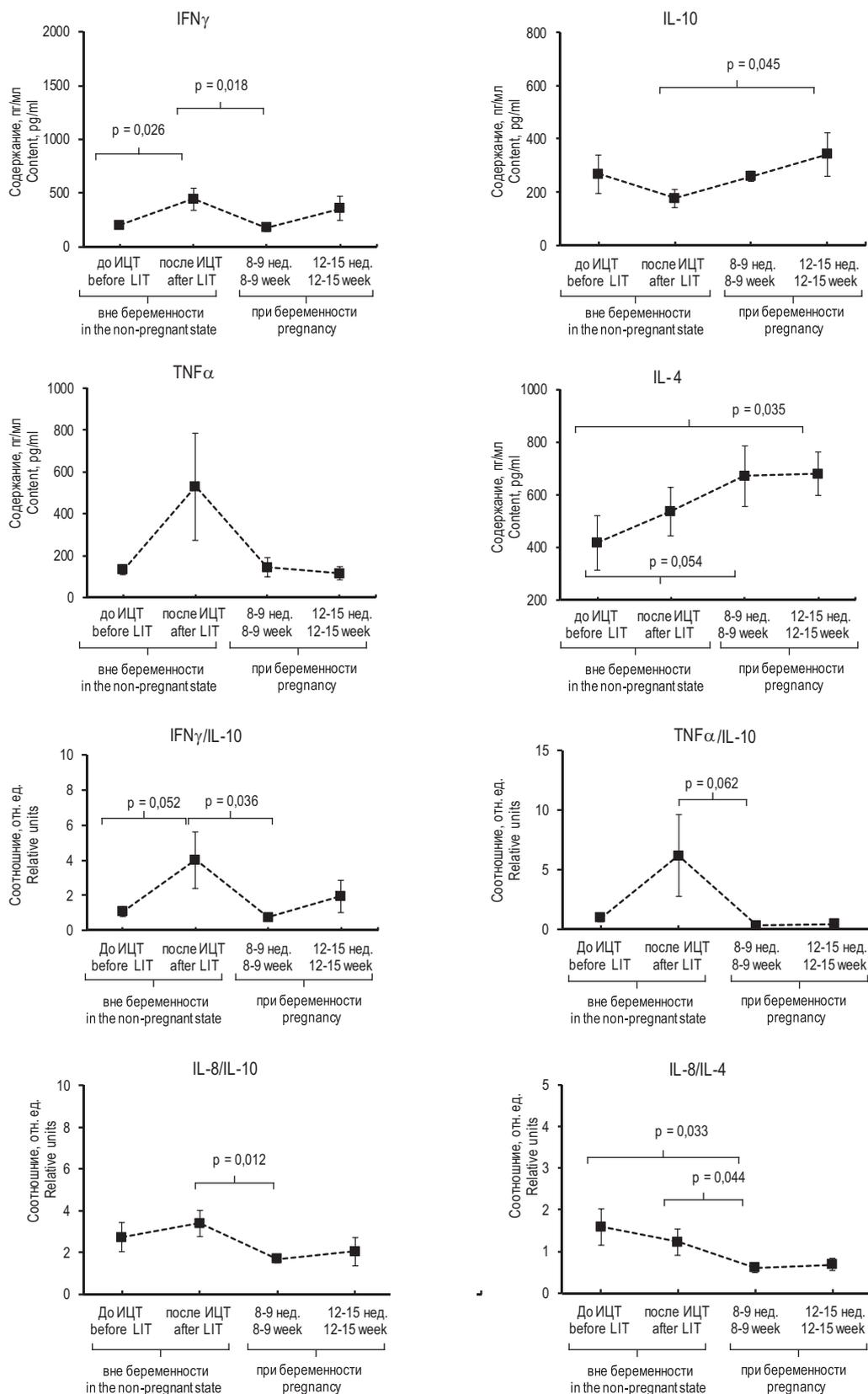


Рисунок 5. Баланс продукции цитокинов про- и противовоспалительной направленности митоген-стимулированными лимфоцитами периферической крови женщин с пролонгированной беременностью

Figure 5. Balance of cytokine production of pro- and antiinflammatory mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes in women with prolonged pregnancy

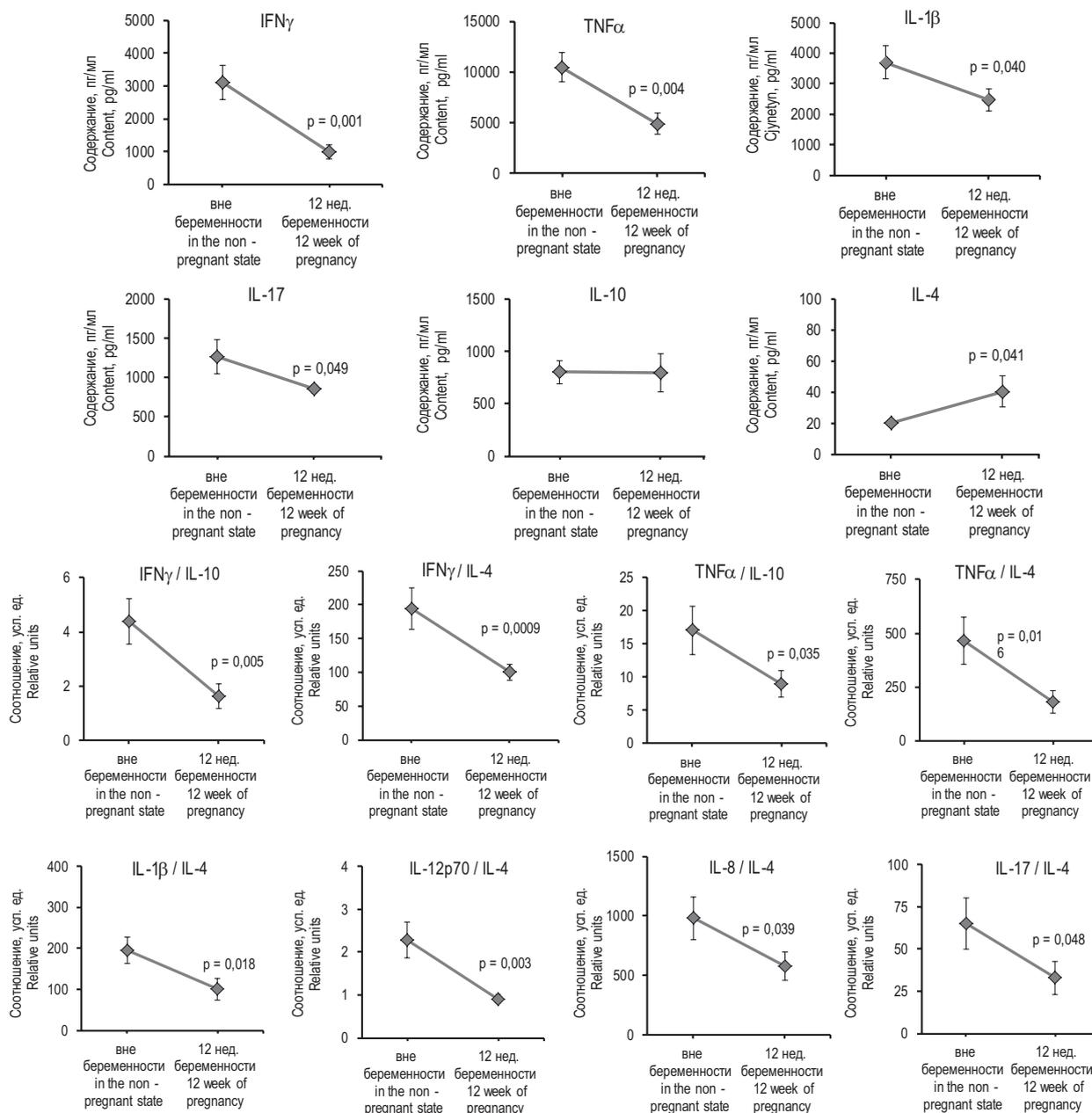


Рисунок 6. Баланс продукции цитокинов про и противовоспалительной направленности митоген-стимулированными лимфоцитами периферической крови женщин контрольных групп

Figure 6. Balance of the production of cytokines pro and anti-inflammatory mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes of women in control groups

($p = 0,012$ и $p = 0,040$), выявляется достоверное снижение продукции IL-1 β ($p = 0,004$) и IL-5 ($p = 0,034$); не изменяются соотношения практически всех исследованных провоспалительных цитокинов к IL-10 (рис. 3Б) и к IL-4 (рис. 3В), выявляется снижение соотношения IL-5/IL-4 ($p = 0,029$) и исчезают различия в соотношении

IL-5/IL-10. Продукция IL-1 β также значимо снижена по сравнению с исходными значениями ($p = 0,037$), а продукция остальных исследованных цитокинов осталась на уровне, одинаковом со значениями до лечения (рис. 4).

Следовательно, после предгестационной аллоиммунизации у пациенток сохранилась склон-

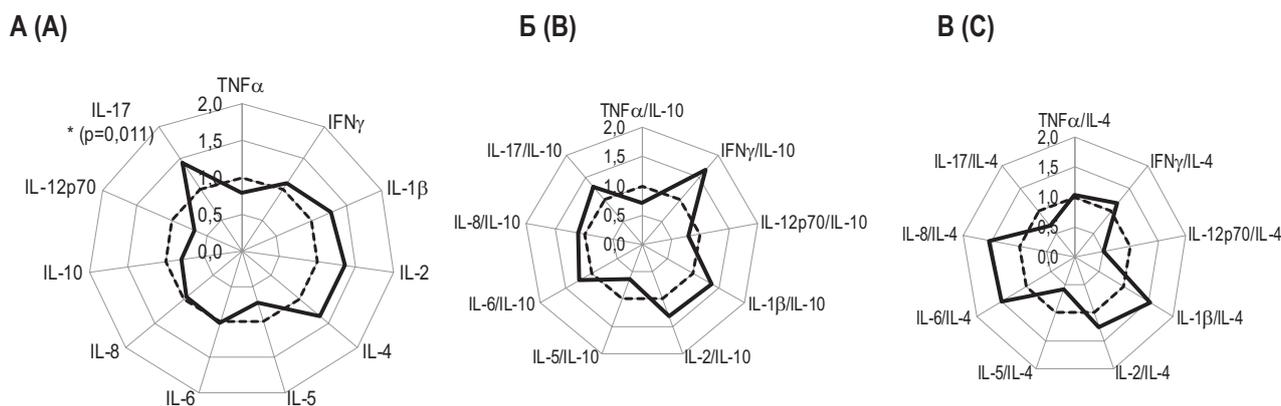


Рисунок 7. Продукция цитокинов *in vitro* клетками цельной крови пациенток с ИПВ в 5-6 недель при доношенной беременности и при выкидыше

Примечание. По осям представлены отношения средних значений показателей в 5-6 недель гестации у пациенток с выкидышем ($n = 7$) к средним значениям у пациенток с доношенной беременностью ($n = 10$). А – содержание цитокинов. Б – отношение содержания провоспалительных цитокинов к IL-10. В – отношение содержания провоспалительных цитокинов к IL-4. Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * – показатель, достоверно отличающийся между группами.

Figure 7. *In vitro* production of cytokines by the whole blood cells of patients with IHM at 5-6 weeks during full-term pregnancy and miscarriage

Note. The axes are the ratios of average values of indicators at 5-6 weeks of gestation in patients with miscarriage ($n = 7$) to average values in patients with full-term pregnancy ($n = 10$). A, cytokine content. B, the ratio of the content of pro-inflammatory cytokines to IL-10. C, the ratio of the content of pro-inflammatory cytokines to IL-4. The dashed line corresponds to the level of equality of values. *, indicator significantly different between groups.

ность к формированию преимущественно Th2-типа иммунных реакций.

Однако у женщин с пролонгированной беременностью после предгестационной ИЦТ выявлено преобладание цитокинов Th1-типа, интенсивность продукции которых резко снижалась к 8-9 неделе гестации (рис. 5). Также выявлено, что в 12 недель физиологической беременности уровень продукции *in vitro* цитокинов провоспалительного профиля значимо ниже, чем у фертильных женщин вне беременности (рис. 6). Указанный результат отражает контроль иммунных реакций в период ранней беременности, включающий воспалительные процессы при имплантации и плацентации.

У пациенток, потерявших данную беременность несмотря на ИЦТ, в 5-6 недель гестации (рис. 7) выявлена более высокая продукция IL-17 ($p = 0,011$), принимающего участие в развитии повреждающих форм воспалительных реакций.

Обсуждение

В ранее проведенных исследованиях нами были получены данные о сходстве субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациенток с пролонгированной беременностью и у женщин с физиологическим течением

беременности, что свидетельствует о нормализации иммунных реакций у женщин с ИПВ после проведенной аллоиммунизации [3].

В данном исследовании показано, что в 12 недель гестации доля FoxP3⁺ и ROR γ t⁺T-клеток среди периферических CD4⁺CD25^{high} лимфоцитов у женщин с доношенной беременностью также не отличалась от доли этих клеток у женщин с физиологической беременностью, что подтверждает предположение о нормализации иммунных реакций у женщин с ИПВ после аллоиммунизации.

До предгестационной аллоиммунизации выявлено преобладание в периферической крови у пациенток с ИПВ ROR γ t⁺ клеток среди лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25^{high}, что согласуется с данными других исследователей [21, 23], соответствует высказанным в литературе предположениям о потере FoxP3⁺ в условиях воспаления [13] и об ассоциации сниженной супрессивной функции Treg при ИПВ с хроническим течением воспалительного процесса. Снижение функции Treg и их содержания в периферической крови, а также в децидуальной оболочке матки при ИПВ отмечается в ряде исследований и является отражением хронического воспаления у этой категории пациенток [17, 26, 27, 34]. Превалирование ROR γ t⁺ клеток среди лимфоцитов с

фенотипом CD4⁺CD25^{high} сохраняется и по окончании предгестационной подготовки.

Однако у пациенток с пролонгированной беременностью в 5-6 недель и в 12 недель гестации доля субпопуляции CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ клеток была одинаковой и не отличалась от доли у женщин в 12 недель физиологической беременности (рис. 1) при стабильном уровне FoxP3⁺Treg на всех сроках обследования.

У пациенток с прервавшейся беременностью после предгестационной аллоиммунизации отмечено снижение уровня FoxP3⁺Treg при отсутствии изменений в уровне CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ клеток, но начальные сроки гестации характеризовались низким уровнем CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ клеток при восстановлении уровня FoxP3⁺Treg до исходного. Подобные резкие изменения в содержании исследованных субпопуляций после аллоиммунизации и в ранние сроки гестации, по-видимому, отражают несбалансированность иммунных механизмов, обеспечивающих развитие беременности у пациенток с выкидышем. Изложенные результаты подтверждают предположения о необходимости баланса в уровне активированных CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ клеток (активированных Th17-клеток) и FoxP3⁺Treg-клеток в ранние сроки гестации для успешного пролонгирования беременности.

Образование периферических индуцибельных специфических Treg-клеток, с которыми связывают формирование толерантности к отцовским антигенам плода, зависит от цитокинового окружения. Именно цитокины образуют регуляторную сеть, обеспечивающую равновесие иммунных реакций между материнским организмом и плодом. От баланса цитокинов в регуляторной сети зависит характер течения ранних сроков беременности и успешность вынашивания плода [2, 25]. Поэтому исследования цитокинового профиля супернатантов активированных *in vitro* лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ необходимы для понимания механизмов, лежащих в основе эффективности ИЦТ в лечении ИПВ.

До предгестационной аллоиммунизации нами выявлено преобладание Th2-типа иммунных реакций у женщин с ИПВ, которое сохраняется и после аллоиммунизации. Однако у женщин с доношенной беременностью получены данные о транзитном формировании Th1-провоспалительного типа иммунных реакций в I триместре. Поскольку беременность у этих женщин завершилась рождением жизнеспособного ребенка в доношенном сроке, полученный результат, с одной стороны, подтверждает необ-

ходимость Th1-реакций для успешности процессов второй волны инвазии трофобласта и плацентации, а с другой — позволяет предположить, что проведение аллоиммунизации способствует контролю уровня провоспалительных реакций.

Нами выявлено, что после предгестационной аллоиммунизации у женщин, потерявших данную беременность, был низкий уровень FoxP3⁺Treg, подавляющих провоспалительные Th17-зависимые реакции, без изменений в уровне активированных Th17-клеток (CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ лимфоцитов). В сроке 5-6 недель уровень CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ лимфоцитов был резко снижен по сравнению с уровнем вне беременности.

Указанные факты в сочетании с данными о высокой продукции в сроке 5-6 недель IL-17 клетками периферической крови в культуре *in vitro* позволяют предположить, что после предгестационной аллоиммунизации у женщин с выкидышем формируется тенденция к провоспалительному типу продукции цитокинов, но в сроке 5-6 недель гестации она реализуется не в направлении Th1, а в направлении Th17-ответа, и низкий уровень в периферической крови клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high}RORγt⁺ может отражать усиленную миграцию Th17-клеток из периферической крови в эндометрий матки, где и разворачиваются все драматические события, связанные с потерей беременности. Последнее свидетельствует о наличии особенностей функционирования иммунной системы у данной категории пациенток с ИПВ, являющихся причиной неэффективности аллоиммунизации в контроле уровня и направленности иммунных реакций во время беременности.

Эффективность аллоиммунизации доказана тем, что у 82% женщин с ИПВ беременность была пролонгирована и завершилась рождением жизнеспособного ребенка, что подтверждает успешное формирование толерантности иммунной системы матери по отношению к антигенам плода, зависящее в том числе и от функциональной активности лимфоидных клеток, мигрирующих к месту имплантации плодного яйца.

Выводы

Результаты проведенных исследований указывают на дисбаланс иммунных реакций у пациенток с ИПВ, потерявших беременность на фоне аллоиммунизации, что согласуется с ранее опубликованными нами данными о различиях в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови [4] и представленными данными о цитокиновом статусе женщин с разными исхо-

дами беременности, наступившей после предгестационной аллоиммунизации.

чения данной процедуры в лечении ИПВ и понижения механизмов ее эффективности.

Заключение

Таким образом, показано влияние иммуноцитотерапии на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и профиль цитокиновой продукции, а также на течение I триместра и исходы наступившей беременности у женщин с идиопатическим привычным выкидышем. Требуются дальнейшие исследования компонентов иммунной системы для поиска критериев назна-

Благодарности

Выражаем огромную благодарность Хачатрян Н.А., Сарибеговой В.А. — аспиранткам 2-го отделения патологии беременности (отделение терапии и профилактики невынашивания беременности) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России за помощь в подборе биологического материала и оценке клинико-анамнестических характеристик пациента.

Список литературы / References

1. Говалло В.И., Быкова Е.Я., Кальке И.К. Сравнительный анализ методов иммунотерапии самопроизвольных выкидышей // *Акушерство и гинекология*, 1985. № 3. С. 41-43. [Govallo V.I., Bykova E.Ya., Kalke I.K. Immunotherapy for spontaneous abortion: a comparative study of different methods. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 1985, no. 3, pp. 41-43. (In Russ.)]
2. Зиганшина М.М., Кречетова Л.В., Ванько Л.В., Николаева М.А., Ходжаева З.С., Сухих Г.Т. Динамика цитокинового профиля в ранние сроки физиологической беременности и при привычном невынашивании в анамнезе // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2012. Т. 154, № 9. С. 371-374. [Ziganshina M.M., Krechetova L.V., Vanko L.V., Nikolaeva M.A., Khodzhaeva Z.S., Sukhikh G.T. Time course of the cytokines profiles during the early period of normal pregnancy and in patients with a history of habitual miscarriage. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2012, Vol. 154, no. 9, pp. 371-374. (In Russ.)]
3. Кречетова Л.В., Тетруашвили Н.К., Вторушина В.В., Степанова Е.О., Николаева М.А., Голубева Е.Л., Хачатрян Н.А. Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови в первом триместре беременности у женщин с привычным выкидышем на фоне проведения иммуноцитотерапии // *Акушерство и гинекология*, 2015. № 6. С. 59-66. [Krechetova L.V., Tetrushvili N.K., Vtorushina V.V., Stepanova E.O., Nikolaeva M.A., Golubeva E.L., Khachatryan N.A. The course of changes in subpopulatiob composition of peripheral blood lymphocytes in the first trimester of pregnancy in women with reccurent miscarriage during immunotherapy. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2015, no. 6, pp. 59-66. (In Russ.)]
4. Кречетова Л.В., Тетруашвили Н.К., Вторушина В.В., Николаева М.А., Хачатрян Н.А., Агаджанова А.А., Ванько Л.В., Иванец Т.Ю., Сухих Г.Т. Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем в зависимости от исхода беременности на фоне иммуноцитотерапии // *Акушерство и гинекология*, 2017. № 7. С. 52-60. [Krechetova L.V., Tetrushvili N.K., Vtorushina V.V., Nikolaeva M.A., Khachatryan N.A., Agadzhanova A.A., Vanko L.V., Ivanets T.Yu., Sukhikh G.T. Characteristics of the phenotype of peripheral blood lymphocytes in women with idiopathic recurrent miscarriage in relation to the outcome of pregnancy during immunocytotherapy. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2017, no. 7, pp. 52-60. (In Russ.)]
5. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / Под ред. Меньшикова В.В. М.: Медицина, 1987. 368 с. [Menshikov V.V., Delektorskaya L.N., Zolotnitskaya R.P. Laboratory research methods in the clinic: a reference book / Ed. Menshikov V.V.]. Moscow: Medicine, 1987. 368 p.
6. Надеина О.В., Любимова А.И., Умбрумянц Д.В. Трансплантация в системе комплексного лечения самопроизвольных потерь беременности // *Акушерство и гинекология*, 1972. № 9. С. 35-38. Nadeina O.V., Lyubimova A.I., Umbrumyants D.V. Transplantation in the complex treatment of spontaneous pregnancy loss. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 1972, no. 9, pp. 35-38. (In Russ.)]
7. Сидельникова В.М. Подготовка и ведение беременности у женщин с привычным невынашиванием: методические рекомендации и клинические протоколы. 3-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2013. 224 с. [Sidelnikova V.M. Preparation and maintenance of pregnancy in women with recurrent pregnancy loss: manuals and clinical guidelines]. Moscow: MEDpress-inform, 2013. 224 p.
8. Ayyoub M., Deknuydt F., Raimbaud I., Dousset C., Leveque L., Bioley G., Valmori D. Human memory FOXP3⁺ Tregs secret IL-17 *ex vivo* and constitutively express the Th17 lineage-specific transcription factor ROR γ t. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 21, pp. 8635-8640.

9. Beer A.E., Quebbeman J.F. The immunobiology and immunopathology of the maternal-fetal relationship. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1982, Vol. 87, pp. 289-326.
10. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L., Kuchroo V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006, Vol. 441, no. 7090, pp. 235-238.
11. Bukovský A., Presl J., Zwinger A., Beran J. Therapeutic transplantation of a skin graft from the partner into an infertile female patient. *Cesk. Gynekol.*, 1988, Vol. 53, no. 4, pp. 291-294.
12. Carp H.J.A. Recurrent pregnancy loss: causes, controversies, and treatment / ed. by H.J.A. Carp. 2nd ed. London: CRC Press, 2014. 456 p.
13. Chen Z., Lin F., Gao Y., Li Z., Zhang J., Xing Y., Deng Z., Yao Z., Tsun A., Li B. FOXP3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int. Immunopharmacol.*, 2011, Vol. 11, no. 5, pp. 536-542.
14. Despodova T. Our experience in treating habitual abortions by skin grafts. *Akush. Ginekol. (Sofia)*, 1985, Vol. 25, no. 2, pp. 42-48. (In Bulg.)
15. Farquharson R.G., Stephenson M.D. Early pregnancy. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2017. 344 p.
16. Gharesi-Fard B., Zolghadri J., Kamali-Sarvestani E. Effect of leukocyte therapy on tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma production in patients with recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2008, Vol. 59, no. 3, pp. 242-250.
17. Guerin L.R., Prins J.R., Robertson S.A. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum. Reprod. Update*, 2009, Vol. 15, no. 5, pp. 517-535.
18. Ichiyama K., Yoshida H., Wakabayashi Y., Chinen T., Saeki K., Nakaya M., Takaesu G., Hor S.i, Yoshimura A., Kobayashi T. Foxp3 Inhibits ROR γ t-mediated IL-17A mRNA Transcription through Direct Interaction with ROR γ t. *J. Biol. Chem.*, 2008, Vol. 283, no. 25, pp. 17003-17008.
19. Ivanov I.I., Zhou L., Littman D.R. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin. Immunol.*, 2007, Vol. 19, no. 6, pp. 409-417.
20. Lee S.K., Na B.J., Kim J.Y., Hur S.E., Lee M., Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J. Determination of clinical cellular immune markers in women with recurrent pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 70, no. 5, pp. 398-411.
21. Lee S.K., Kim J.Y., Hur S.E., Kim C.J., Na B.J., Lee M., Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J. An imbalance in interleukin-17-producing T and Foxp3⁺ regulatory T cells in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum. Reprod.*, 2011, Vol. 26, no. 11, pp. 2964-2971.
22. Liang P., Mo M., Li G.G., Yin B., Cai J., Wu T., He X., Zhang X., Zeng Y. Comprehensive analysis of peripheral blood lymphocytes in 76 women with recurrent miscarriage before and after lymphocyte immunotherapy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2012, Vol. 68, no. 2, pp. 164-174.
23. Liu Y.S., Wu L., Tong X.H., Wu L.M., He G.P., Zhou G.X., Luo L.H., Luan H.B. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 65, no. 5, pp. 503-511.
24. Rafiee M., Gharagozloo M., Ghahiri A., Mehrabian F., Maracy M.R., Kouhpayeh S., Pieper I.L., Rezaei A. Altered Th17/Treg ratio in recurrent miscarriage after treatment with paternal lymphocytes and vitamin D3: a double-blind placebo-controlled study. *Iran. J. Immunol.*, 2015, Vol. 12, no. 4, pp. 252-262.
25. Saini V., Arora S., Yadav A., Bhattacharjee J. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *Clin. Chim. Acta*, 2011, Vol. 412, no. 9, pp. 702-708.
26. Saito S., Shima T., Nakashima A., Shiozaki A., Ito M., Sasaki Y. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2007, Vol. 24, no. 9, pp. 379-386.
27. Wang W.J., Hao C.F., Yi-Lin, G.J. Yin, Bao S.H., Qiu L.H., Lin Q.D. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 84, no. 2, pp. 164-170.
28. Wilczyński J.R., Radwan P., Tchórzewski H., Banasik M. Immunotherapy of patients with recurrent spontaneous miscarriage and idiopathic infertility: does the immunization-dependent Th2 cytokine overbalance really matter? *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2012, Vol. 60, no. 2, pp. 151-160.
29. Williams Z. Inducing tolerance to pregnancy. *N. Engl. J. Med.*, 2012, Vol. 367, no. 12, pp. 1159-1161.
30. Wu L., Luo L.H., Zhang Y.X., Li Q., Xu B., Zhou G.X., Luan H.B., Liu Y.S. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2014, Vol. 12, no. 1, 74. doi: 10.1186/1477-7827-12-74.
31. Yamada H., Morikawa M., Furuta I., Kato E.H., Shimada S., Sata F., Kishi R., Minakami H. Circulating cytokines during early pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion: decreased TNF-alpha levels in abortion with normal chromosome karyotype. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 2004, Vol. 79, no. 3, pp. 237-241.

32. Yang H., Qiu L., Di W., Zhao A., Chen G., Hu K., Lin Q. Proportional change of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil. Steril.*, 2009, Vol. 92, no. 1, pp. 301-305.
33. Yoo J.H., Kwak-Kim J., Han A.R., Ahn H., Cha S.H., Koong M.K., Kang I.S., Yang K.M. Peripheral blood NK cell cytotoxicities are negatively correlated with CD8(+) T cells in fertile women but not in women with a history of recurrent pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2012, Vol. 68, no. 1, pp. 38-46.
34. Zenclussen A.C. Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin. Immunopathol.*, 2006, Vol. 28, no. 1, pp. 31-39.
35. Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M., Ivanov I.I., Min R., Victora G.D., Shen Y., Du J., Rubtsov Y.P., Rudensky A.Y., Ziegler S.F., Littman D.R. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature*, 2008, Vol. 453, no. 7192, pp. 236-240.

Авторы:

Кречетова Л.В. — д.м.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Вторушина В.В. — к.м.н., врач иммунолог-аллерголог ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ивняева Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ванько Л.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Николаева М.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Тетруашвили Н.К. — д.м.н., заведующая отделением патологии беременности (отделение терапии и профилактики невынашивания беременности) ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Krechetova L.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Vtorushina V.V., PhD (Medicine), Clinical Immunologist-Allergologist, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Inviyaeva E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Vanko L.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Nikolaeva M.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Tetruashvili N.K., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Pregnancy Pathology (Department of Therapy and Prevention of Miscarriage), V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Поступила 09.09.2019
Отправлена на доработку 05.12.2019
Принята к печати 27.12.2019

Received 09.09.2019
Revision received 05.12.2019
Accepted 27.12.2019

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЖИТЕЛЕЙ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

Арсентьева Н.А.¹, Любимова Н.Е.¹, Бацунов О.К.^{1,2}, Семенов А.В.^{1,2},
Тотолян Арег А.^{1,2}

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

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

Резюме. Система цитокинов – большая группа факторов, продуцируемых клетками иммунной системы и участвующих в патогенезе большинства заболеваний человека. Для оценки значимости изменений цитокинов/хемокинов при патологических состояниях необходимо знать физиологический диапазон этих молекул у здоровых людей. В литературе подавляющее большинство исследований по оценке различных цитокинов/хемокинов в плазме крови практически здоровых лиц проводили на популяции жителей Западной Европы и Северной Америки. Известны межпопуляционные различия в синтезе определенных цитокинов у разных расовых и национальных групп. Представлены лишь единичные сведения о нормальном уровне некоторых цитокинов в плазме крови здоровых жителей Африканского континента. Целью данной работы было определение особенностей цитокинового профиля плазмы крови практически здоровых жителей Гвинейской Республики и установление нормальных значений цитокинов. Было обследовано 24 практически здоровых жителя Гвинейской Республики в возрасте от 25 до 64 лет и 23 жителя Санкт-Петербурга в возрасте от 25 до 61 года. Определяли концентрации 40 цитокинов/хемокинов. Исследование проводили с помощью мультиплексного анализа с применением технологии xMAP (Luminex, США) с использованием наборов с магнитными частицами Bio-Plex Pro Human Chemokine Assay (Bio-Rad, США). В плазме крови жителей Гвинейской Республики были достоверно повышены концентрации следующих цитокинов и хемокинов: IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , CCL1/I-309, CCL3/MIP-1 α , CCL7/MCP-3, CCL17/TARC, CCL19/MIP-3 β , CCL20/MIP-3 α , CCL21/6Ckine, CXCL2/Gro- β , CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL9/MIG, CX3CL1/Fractalkine ($p < 0,001$). Для хемокинов CCL8/MCP-2, CCL22/MDC, CXCL1/Gro- α и CXCL12/SDF-1 α + β наблюдалась тенденция к повышению их концентрации по сравнению с жителями Санкт-Петербурга ($p < 0,05$). В то же время уровни CCL23/MIP1-1 и MIP были достоверно ниже ($p < 0,0001$) в группе жителей Гвинейской Республики. Для хемокинов CCL2/MCP-1 и CCL24/Eotaxin-2 наблюдалась тенденция к снижению их уровня ($p < 0,05$) в плазме крови жителей Гвинейской Республики. В обследованных группах не обнаружено различий в содержании цитокинов/хемокинов: GM-CSF, IL-1 β , IL-16, CCL11/Eotaxin, CCL13/MCP-4, CCL15/Leukotactin-1, CCL25/TECK, CCL26/Eotaxin-3, CCL27/CTACK, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL13/BCA и CXCL16/SCYB16.

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

Arsentieva Natalia A.
St. Petersburg Pasteur Institute
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone: 7 (904) 646-57-58.
E-mail: arsentieva_n.a@bk.ru

Образец цитирования:

Н.А. Арсентьева, Н.Е. Любимова, О.К. Бацунов,
А.В. Семенов, Арег А. Тотолян «Особенности
цитокинового профиля плазмы крови здоровых
жителей Гвинейской Республики» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 765-778.
doi: 10.15789/1563-0625-АОВ-2073

© Арсентьева Н.А. и соавт., 2020

For citation:

N.A. Arsentieva, N.E. Lyubimova, O.K. Batsunov,
A.V. Semenov, Areg A. Totolian "Analysis of blood plasma
cytokine profile in healthy residents of the Republic of Guinea",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 4, pp. 765-778.
doi: 10.15789/1563-0625-АОВ-2073

DOI: 10.15789/1563-0625-АОВ-2073

В настоящем исследовании впервые определены границы нормы содержания широкого спектра цитокинов/хемокинов в плазме крови у жителей Африканского региона. Выявлены межпопуляционные различия, в том числе среди конститутивных хемокинов. Различные уровни конститутивных хемокинов CCL19/MIP-3 β и CCL21/6Ckine – лигандов рецептора CCR7 – в двух популяциях косвенно могут свидетельствовать о физиологических особенностях созревания Т-клеток. Повышенный уровень в плазме крови гвинейцев лигандов рецептора CXCR2 – CXCL2/Gro- β , CXCL5/ENA-78 и CXCL6/GCP-2 – может быть связан с тем, что эти хемокины также являются лигандами для атипичного хемокинового рецептора DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines), обеспечивающего нейтрализацию хемокинов из кровотока, а 95% жителей Западной Африки имеют мутации в гене DARC и не экспрессируют этот рецептор. Повышенное содержание провоспалительных цитокинов IL-6, TNF α и хемокина CCL20/MIP-3 α в плазме жителей Гвинейской Республики, возможно, свидетельствует о воспалительных процессах в печени, так как среди обследованных нами гвинейцев у 100% людей были выявлены антитела против вируса гепатита А, у 48% – антитела против вируса гепатита В (анти-HBs) и у 12% – антитела против вируса гепатита С. В целом различия в содержании цитокинов/хемокинов могут быть связаны с разной средой обитания, циркуляцией инфекционных заболеваний, содержанием микробиоты кишечника, кожи и слизистых, а также генетическими различиями.

Ключевые слова: цитокины, хемокины, мультиплексный анализ, нормальные значения, здоровые жители, Республика Гвинея

ANALYSIS OF BLOOD PLASMA CYTOKINE PROFILE IN HEALTHY RESIDENTS OF THE REPUBLIC OF GUINEA

Arsentieva N.A.^a, Lyubimova N.E.^a, Batsunov O.K.^{a,b}, Semenov A.V.^{a,b},
Totolian Areg A.^{a,b}

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. The cytokine system is a large group of humoral factors produced by immune cells and involved in the pathogenesis of most human diseases. To assess the significance of changes in cytokines/chemokines under pathological conditions, appropriate reference values are required for healthy people. As known from existing literature, most studies of various cytokine/chemokine concentrations in blood plasma were performed in healthy subjects from Western Europe and North America. Certain inter-population differences are known, with respect to production of distinct cytokines in different racial and national groups. Only single studies concern normal levels of distinct cytokines in blood plasma of healthy African residents. The purpose of this study was to determine the blood plasma cytokine profile in healthy residents of the Republic of Guinea (RG), and to establish normal cytokine values.

We have examined 24 healthy RG residents and 23 residents of St. Petersburg. Concentrations of 40 cytokines/chemokines were determined in blood plasma. The study was performed using multiplex analysis by xMAP technology.

The following cytokine/chemokine levels were significantly increased in the blood plasma of the RG residents: IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , CCL1/I-309, CCL3/MIP-1 α , CCL7/MCP-3, CCL17/TARC, CCL19/MIP-3 β , CCL20/MIP-3 α , CCL21/6Ckine, CXCL2/Gro- β , CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL9/MiG, CX3CL1/Fractalkine ($p < 0.001$). For the CCL8/MCP-2, CCL22/MDC, CXCL1/Gro- α and CXCL12/SDF-1 α + β chemokines a trend for increased concentration was revealed, in comparison with residents of St. Petersburg ($p < 0.05$). Moreover, the levels of CCL23/MPIF-1 and MIF were significantly lower ($p < 0.0001$) in the RG residents. There was a tendency for decreased levels ($p < 0.05$) for CCL2/MCP-1 and CCL24/Eotaxin-2 chemokines in blood plasma taken from RG residents. There were no differences in levels of cytokines/chemokines for the studied groups: GM-CSF, IL-1 β , IL-16, CCL11/Eotaxin, CCL13/MCP-4, CCL15/Leukotactin-1, CCL25/TECK, CCL26/Eotaxin-3, CCL27/CTACK, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL13/BCA, and CXCL16/SCYB16. Hence, this study has presented for the first time

the normal limits for a wide range of cytokines/chemokines in blood plasma of the African inhabitants. Inter-population differences were found, including those for constitutive chemokines. Different levels of CCL19/MIP-3 β and CCL21/6Ckine chemokines (the CCR7 receptor ligands) for the two populations may indirectly indicate the physiological features of T-cell maturation. Increased levels of CXCR2 receptor ligands in the blood plasma of Guineans, i.e., CXCL2/Gro- β , CXCL5/ENA-78 and CXCL6/GCP-2, may be due to additional function of these chemokines as ligands for atypical DARC chemokine receptor, which neutralizes chemokines from the blood flow, whereas 95% of West Africans have mutations in the DARC gene and do not express this receptor. Increased levels of proinflammatory IL-6 and TNF α cytokines, and chemokine CCL20/MIP-3 α in blood plasma from RG residents may suggest inflammatory processes in the liver, since 100% of the examined Guineans had antibodies against the hepatitis A virus, 48% had antibodies to hepatitis B virus (anti-HBs), and 12% had antibodies against hepatitis C virus. In summary, the differences in cytokine/chemokine level may be related to specific environment, circulation of infectious diseases, composition of intestinal, skin and mucosal microbiota, as well as distinct genetic features.

Keywords: cytokines, chemokines, multiplex analysis, normal values, healthy residents, Republic of Guinea

Введение

Цитокины – белки, продуцируемые преимущественно активированными клетками кроветворной и иммунной систем, которые опосредуют межклеточные взаимодействия при кроветворении, воспалении, иммунных процессах и межсистемных коммуникациях, это самая многочисленная и универсальная в функциональном отношении группа гуморальных факторов системы иммунитета. Цитокины считаются плеiotропными молекулами, которые участвуют как в физиологических, так и в патологических процессах [45]. К семейству цитокинов принадлежат более 200 молекул: интерлейкины (IL) с исторически сложившимися порядковыми номерами, семейство фактора некроза опухоли (TNF), интерфероны (IFN), колониестимулирующие факторы (CSF), трансформирующие ростовые факторы и хемокины [4]. Последние представляют наиболее многочисленную группу. В зависимости от структуры молекулы среди них выделяют следующие семейства: C, CC, CXC, CX3C. Основная функция хемокинов заключается в контроле направленной клеточной миграции. Они участвуют в воспалительных реакциях, процессах ангиогенеза, пролиферации и репарации, онкогенезе, метастазировании, развитии лимфоидных органов и тканей [24]. Также все хемокины разделяют на конститутивные и провоспалительные [51].

Благодаря своим биологическим свойствам цитокины участвуют в патогенезе всех иммунопатологических процессов: инфекционных, аллергических, аутоиммунных и лимфопролиферативных. Определение содержания цитокинов в различных биологических жидкостях можно использовать для оценки активности воспаления, поляризации иммунного ответа, эффективности проводимой терапии и прогноза заболевания.

Таким образом, цитокины вообще и хемокины в частности являются важными мишенями для диагностики широкого круга заболеваний человека, а их исследование важно для полного понимания механизма иммунологических изменений, наблюдаемых у пациентов, страдающих от различных заболеваний. Однако для оценки значимости модуляции цитокинов и хемокинов при патологических состояниях необходимо знать физиологический диапазон этих молекул у здоровых людей [1]. Для этого необходимо установить нормальные значения цитокинов и хемокинов здоровых лиц и понимать, отличаются ли они в различных популяциях людей.

Известны межпопуляционные различия содержания некоторых цитокинов и хемокинов. Например, имеются данные о различиях в синтезе определенных цитокинов среди популяций России в разных национальных группах. Известно, что различные расовые группы имеют разное распределение аллелей генов цитокинов [11]. Результатом этого могут являться как различия в секреции цитокинов, так и потеря или изменение функций белковых молекул из-за преобразования структуры.

В литературе подавляющее большинство исследований по оценке различных цитокинов/хемокинов в плазме крови практически здоровых лиц проводили на популяции жителей Западной Европы и Северной Америки. Представлены лишь единичные сведения о нормальном уровне некоторых цитокинов в плазме крови здоровых жителей Африканского континента [35, 43].

Целью данной работы стало определение особенностей цитокинового профиля плазмы крови практически здоровых жителей Гвинейской Республики и установление нормальных значений цитокинов.

Материалы и методы

В настоящей работе было обследовано 24 практически здоровых жителя Гвинейской Республики в возрасте от 25 до 64 лет и 23 жителя Санкт-Петербурга в возрасте от 25 до 61 года, которые сформировали группу сравнения. В выборке жителей Гвинейской Республики были в основном мужчины (87,5%), в группе сравнения соотношение мужчин и женщин составило 40/60%. От каждого участника, включенного в исследование, было получено информированное письменное согласие. На проведение данного исследования было получено согласие локального этического комитета Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

В исследование были включены лица, у которых отсутствовали острые воспалительные заболевания и не наблюдались хронические заболевания на момент обследования. Обследование жителей Гвинейской Республики проводилось на второй день после приезда в Российскую Федерацию.

В периферической крови всех обследованных лиц методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли серологические показатели вирусных гепатитов: HBsAg, антитела класса IgG к вирусному гепатиту В (ВГВ): анти-HBs, анти-HBcor, вирусному гепатиту А (ВГА) – анти-HAV, вирусному гепатиту С (ВГС) – анти-HCV, вирусному гепатиту D – анти-HDV, вирусному гепатиту E – анти-HEV, а также антитела против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) – анти-HIV. Методом полимеразной цепной реакции проведен анализ образцов крови для определения наличия генетического материала вирусов гепатитов В, С и D. Только у одного обследованного жителя Гвинейской Республики в крови был обнаружен HBsAg, у двоих людей (8%) обнаружена ДНК вируса гепатита В, при этом у обследованных лиц обнаружены антитела против вируса гепатита В: у 48% (12 человек) – anti-HBs, у 96% (23 человек) – anti-HBcor. У всех обследованных жителей Гвинейской Республики обнаружены антитела против вируса гепатита А (анти-HAV). У 3 человек (12%) обнаружены антитела против вируса гепатита С (анти-HCV), при этом РНК вируса не обнаружена. У всех обследованных лиц не обнаружены антитела против вируса гепатита D (анти-HDV), у одного человека (4%) найдены антитела против вируса гепатита E (анти-HEV). У всех обследованных жителей Гвинейской Республики антител против ВИЧ не найдено. В крови всех обследованных жителей Санкт-Петербурга

лабораторные показатели вирусных гепатитов и ВИЧ-инфекции не обнаружены.

Материалом исследования служила периферическая кровь. Образцы крови забирали в вакуумные пробирки с антикоагулянтом К₂ЭДТА, центрифугировали при 250 g в течение 10 минут для отделения плазмы. Плазму отбирали в криопробирки, замораживали и хранили при -80 °С до проведения анализа.

Определяли концентрации следующих цитокинов/хемокинов: CCL1/I-309, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL11/Eotaxin, CCL13/MCP-4, CCL15/Leukotactin-1, CCL17/TARC, CCL19/MIP-3 β , CCL20/MIP-3 α , CCL21/6Ckine, CCL22/MDC, CCL23/MIP-1, CCL24/Eotaxin-2, CCL25/TECK, CCL26/Eotaxin-3, CCL27/CTACK, CXCL1/Gro- α , CXCL2/Gro- β , CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1 α + β , CXCL13/BCA-1, CXCL16/SCYB16, CX3CL1/Fractalkine, GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-16, MIF, TNF α . Исследование проводили с помощью мультиплексного анализа с применением технологии xMAP (Luminex, США) с использованием наборов с магнитными частицами Bio-Plex Pro Human Chemokine Assay (Bio-Rad, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Регистрацию и анализ данных проводили на приборе Luminex MAGPIX (Luminex, США).

Анализ результатов и статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 5. Поскольку полученные данные не подчинялись нормальному распределению, для анализа выборок использовали методы непараметрической статистики. Для межгрупповых сравнений применяли критерий Манна–Уитни. Достоверными считали различия при уровне значимости $p \leq 0,001$. Результаты представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$).

Результаты

Результаты определения концентрации хемокинов представлены в таблице 1.

В плазме крови обследованных жителей Гвинейской Республики была достоверно повышена концентрация следующих хемокинов: CCL1/I-309, CCL3/MIP-1 α , CCL7/MCP-3, CCL17/TARC, CCL19/MIP-3 β , CCL20/MIP-3 α , CCL21/6Ckine, CXCL2/Gro- β , CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL9/MIG, CX3CL1/Fractalkine ($p < 0,001$). В содержании хемокинов CCL8/MCP-2, CCL22/MDC, CXCL1/Gro- α и

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ХЕМОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЖИТЕЛЕЙ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (ГР) И САНКТ-ПЕТЕРБУРГА (СПб.), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. PLASMA CHEMOKINES LEVEL IN THE REPUBLIC OF GUINEA (RG) AND ST. PETERSBURG (SPb.) RESIDENTS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Хемокин, пг/мл Chemokine, pg/ml	Жители ГР RG residents	Жители СПб. SPb. residents	р	Группа Group	Рецептор Receptor
CCL1/I-309	100,3 (96,5-109,6)	87,8 (81,8-96,2)	< 0,0001	В I	CCR8
CCL2/MCP-1	21,66 (18,7-32,4)	29,57 (22,24-42,65)	0,0316	В I	CCR2
CCL3/MIP-1 α	7,6 (6,8-8,2)	6,4 (5,8-7,5)	0,0013	В I	CCR1,5
CCL7/MCP-3	196,6 (183,3-221,3)	153,0 (129,0-176,6)	< 0,0001	В I	CCR1,2,3
CCL8/MCP-2	46,1 (39,1-52,3)	36,8 (27,9-45,9)	0,0124	В I	CCR1,2,5
CCL11/Eotaxin	47,1 (40,7-65,2)	61,1 (45,8-79,5)	0,0847	В/К I/H	CCR3,5
CCL13/MCP-4	67,4 (56,5-94,4)	52,6 (41,6-97,8)	0,2093	В I	CCR2,3
CCL15/Leukotactin-1	5874,0 (4053,0-8098,0)	6651,0 (4181,0-8995,0)	0,4892	В I	CCR1,3
CCL17/TARC	97,91 (74,94-114,50)	54,78 (45,52-75,80)	< 0,0001	В/К I/H	CCR4
CCL19/MIP-3 β	292,8 (212,6-353,4)	147,3 (104,6-205,6)	< 0,0001	К H	CCR7
CCL20/MIP-3 α	19,1 (16,0-25,9)	9,9 (8,3-12,2)	< 0,0001	В/К I/H	CCR6
CCL21/6Ckine	10006,0 (9216,0-10558,0)	7577,0 (6549,0-8791,0)	0,0005	К H	CCR7
CCL22/MDC	929,0 (830,5-1244,0)	783,7 (679,5-959,7)	0,0325	В/К I/H	CCR4
CCL23/MIP-1	54,3 (35,3-70,9)	231,8 (183,2-442,2)	< 0,0001	В I	CCR1
CCL24/Eotaxin-2	183,5 (123,1-254,3)	290,1 (166,9-512,6)	0,0177	К H	CCR3
CCL25/TECK	766,4 (681,4-908,3)	929,2 (662,7-1209,0)	0,1228	К H	CCR9
CCL26/Eotaxin-3	66,5 (55,6-74,1)	68,3 (54,5-77,4)	0,8231	В I	CCR3
CCL27/CTACK	1042,0 (764,6-1338,0)	1079,0 (847,9-1335,0)	0,6021	К H	CCR10
CXCL1/Gro- α	876,6 (490,2-1096,0)	98,0 (70,4-137,5)	0,0041	В I	CXCR2
CXCL2/Gro- β	365,0 (330,5-453,1)	314,4 (278,8-401,1)	< 0,0001	В I	CXCR2
CXCL5/ENA-78	1066 (821,6-1708,0)	591,6 (496,2-670,4)	< 0,0001	В I	CXCR2
CXCL6/GCP-2	79,9 (62,8-110,1)	30,3 (24,5-33,5)	< 0,0001	В I	CXCR1,2

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Хемокин, пг/мл Chemokine, pg/ml	Жители ГР RG residents	Жители СПб. SPb. residents	р	Группа Group	Рецептор Receptor
CXCL8/IL-8	11,1 (9,0-15,1)	13,3 (8,5-20,4)	0,3713	В I	CXCR1,2
CXCL9/MIG	250,9 (200,5-308,8)	162,6 (134-205,6)	< 0,0001	В I	CXCR3
CXCL10/IP-10	147,8 (131,9-188,3)	161,8 (115,5-207,1)	0,7984	В I	CXCR3
CXCL11/I-TAC	43,4 (36,9-60,5)	47,1 (34,3-60,3)	0,9915	В I	CXCR3,7
CXCL12/SDF-1 α + β	1734,0 (1501,0-2030,0)	1444,0 (1268,0-1769,0)	0,0421	К H	CXCR4,7
CXCL13/BCA-1	29,6 (24,7-37,9)	26,1 (19,7-33,9)	0,0773	К H	CXCR3,5
CXCL16/SCYB16	400,6 (317,6-469,1)	431,8 (383,8-503,0)	0,2376	В I	CXCR6
CX3CL1/Fractalkine	136,8 (121,7-168,3)	101,5 (89,7-114,9)	< 0,0001	В/К I/H	CX3CR1

Примечание. В – провоспалительный хемокин, К – конститутивный хемокин.

Note. I, inflammatory chemokines; H, homeostatic chemokines.

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЖИТЕЛЕЙ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (ГР) И САНКТ-ПЕТЕРБУРГА (СПБ.), Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. PLASMA SOME CYTOKINES LEVEL IN THE REPUBLIC OF GUINEA (RG) AND ST. PETERSBURG (SPb.) RESIDENTS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Жители ГР RG residents	Жители СПб. SPb. residents	р
GM-CSF	0,0 (0,0-30,7)	19,8 (0,0-44,9)	0,0675
IFN γ	77,8 (70,4-84,0)	55,2 (45,4-64,7)	< 0,0001
IL-1 β	6,6 (5,8-8,4)	4,4 (3,7-10,3)	0,2776
IL-2	16,1 (14,9-19,3)	12,3 (10,3-13,2)	< 0,0001
IL-4	42,4 (39,7-45,7)	35,3 (30,2-40,7)	0,0003
IL-6	10,8 (8,7-12,3)	5,7 (4,3-7,7)	< 0,0001
IL-10	33,4 (29,0-42,0)	23,5 (18,0-29,3)	< 0,0001
IL-16	990,0 (740,4-1338,0)	846,0 (607,0-1935,0)	0,6782
MIF	1121,0 (777,9-1435,0)	11146,0 (6366,0-23003,0)	< 0,0001
TNF α	48,4 (41,5-52,2)	35,1 (28,8-38,9)	< 0,0001

CXCL12/SDF-1 α + β наблюдалась тенденция к повышению по сравнению с жителями Санкт-Петербурга ($p < 0,05$). В то же время уровень CCL23/MIP-1 был достоверно ниже в группе жителей Гвинейской Республики ($p < 0,0001$). Для хемокинов CCL2/MCP-1 и CCL24/Eotaxin-2 наблюдалась тенденция к снижению в группе жителей Гвинейской Республики ($p < 0,05$). В группах обследованных не было обнаружено достоверных ($p > 0,05$) различий в содержании следующих хемокинов: CCL11/Eotaxin, CCL13/MCP-4, CCL15/Leukotactin-1, CCL25/TECK, CCL26/Eotaxin-3, CCL27/CTACK, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL13/BCA и CXCL16/SCYB16.

Результаты определения концентраций цитокинов представлены в таблице 2.

В плазме крови жителей Гвинейской Республики были выявлены достоверно повышенные концентрации следующих цитокинов: IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α ($p < 0,0001$), при этом уровень MIF был достоверно снижен ($p < 0,0001$), по сравнению с жителями Санкт-Петербурга. При анализе цитокинов GM-CSF, IL-1 β и IL-16 достоверных ($p > 0,05$) различий в их содержании у обследованных лиц не обнаружено.

Обсуждение

По нашим данным, концентрации трех провоспалительных хемокинов: CCL1/I-309, CCL3/MIP-1 α , CCL7/MCP-3 были достоверно выше у гвинейцев по сравнению с гражданами Российской Федерации. Эти хемокины принимают участие в патогенезе различных инфекционных заболеваний, в том числе ВИЧ-инфекции. По данным официальной статистики больше всего людей, живущих с ВИЧ/СПИДом, находится в Африке [14]. В 2014 г. в Республике Гвинея выявлено 10 871 ВИЧ-инфицированных (0,58 случаев на 100 тыс. населения). В структуре заболеваемости ВИЧ-инфекция занимала 9-е место по количеству регистрируемых случаев, однако в структуре общей смертности на долю этой инфекции приходилось 5% (4 место). На основании лабораторного обследования выборки из 5566 человек средняя пораженность ВИЧ населения, обратившегося за медицинской помощью в 2015-2017 гг., составила 3,6% [3]. В 2018 году в Республике Гвинея было зарегистрировано 1,5% населения ВИЧ-инфицированных. Хемокин CCL1/I-309 секретируют активированные Т-клетки, он связывается с эндотелиальными клетками, стимулирует хемотаксис моноцитов, НК-клеток и незрелых В-лимфоцитов, принимает участие в

ангиогенезе [19]. Хемокин CCL1/I-309 проявляет антиапоптотическую активность [46]. CCL7/MCP-3 привлекает макрофаги при воспалении и метастазах. Этот белок также участвует в рекрутинге и активации лейкоцитов. CCL7/MCP-3 в низких концентрациях препятствует инфицированию ВИЧ-1. CCL3/MIP- α вырабатывается различными клетками врожденного иммунитета, а также Т- и В-лимфоцитами. Белок играет существенную роль при туберкулезе, ВИЧ-инфекции и других инфекционных заболеваниях. Повышение этих хемокинов в группе жителей Гвинейской Республики может свидетельствовать о наличии у них воспаления. Стоит отметить, что большинство данных о повышении этих хемокинов были получены при обследовании европейцев. При этом исследования концентраций хемокинов у жителей Африканского региона малочисленны, возможно, что такие значения являются нормальными в данной популяции.

В нашем исследовании было показано, что концентрации хемокинов CCL19/MIP-3 β и CCL21/6CKine в плазме крови жителей Гвинейской Республики значительно повышены по сравнению с гражданами Российской Федерации. CCL19/MIP-3 β и CCL21/6CKine относят к конститутивным хемокинам. CCL19/MIP-3 β в основном синтезируют посткапиллярные венулы с высоким эндотелием, а CCL21/6CKine – стромальные и дендритные клетки Т-зависимых зон периферических лимфоидных органов. Общим рецептором для них служит CCR7, так называемый рецептор «хоуминга». Основная функция этих хемокинов заключается в привлечении клеток иммунной системы, несущих на своей поверхности рецептор CCR7, в первую очередь дендритных клеток, Т- и В-лимфоцитов, во вторичные лимфоидные органы [21, 40, 41]. Известно, что по мере созревания Т-клеток и приобретения эффекторных функций изменяется характер экспрессии рецептора CCR7 [7, 8]. Присутствие на мембране клетки CCR7 позволяет выделить популяции «наивных» Т-клеток и Т-клеток центральной памяти среди всех циркулирующих Т-лимфоцитов. При этом на поверхности эффекторных клеток и терминально-дифференцированных эффекторов отсутствует экспрессия этого рецептора, поскольку функции этих клеток реализуются вне лимфоидной ткани. Помимо цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов (Th), рецептор CCR7 обнаружен на поверхности фолликулярных Th, которые присутствуют не только в лимфоидной ткани, но и в циркуляции. Показано, что экспрессия CCR7 усиливается при стимуляции Т-лимфоцитов

IL-2 [47]. При этом в плазме крови жителей Гвинеиской Республики обнаружено значительное возрастание уровня IL-2, по сравнению с жителями Санкт-Петербурга, что, в свою очередь, может быть связано с рецептором CCR7 и его лигандами. Различные уровни конститутивных хемокинов CCL19/MIP-3β и CCL21/6Ckine в двух популяциях косвенно могут свидетельствовать о физиологических особенностях в созревании Т-клеток, что представляет интерес и требует дальнейшего исследования.

Уровни лигандов рецептора CXCR2 – CXCL2/Gro-β, CXCL5/ENA-78 и CXCL6/GCP-2 в плазме крови гвинейцев значительно превышали значения жителей Санкт-Петербурга (в 1,1; 1,8 и 2,6 раза соответственно). Кроме общего рецептора CXCR2, характерным для этих трех хемокинов является способность с высокой афинностью взаимодействовать с атипичным хемокиновым рецептором DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines), который изначально был описан как антиген системы групп крови – Даффи-антиген [25]. Этот антиген состоит из двух разных вариантов, Fy^a и Fy^b, которые отличаются одной точечной мутацией, кодируемой двумя кодоминантными аллелями [48]. У людей с Даффи-положительным фенотипом (Fy^(a+b-), Fy^(a+b+) и Fy^(a-b+)) рецептор DARC в большом количестве представлен на эритроцитах, также он экспрессируется на других типах клеток, в том числе на эндотелиальных [22]. На эндотелии DARC, по-видимому, участвует в трансцитозе хемокинов и представлении лейкоцитов крови. Напротив, считается, что DARC на эритроцитах способствует захвату хемокинов плазмы крови и их внутриклеточному хранению, таким образом, он обеспечивает нейтрализацию хемокинов из циркуляции [42]. Помимо выполнения функции атипичного хемокинового рецептора, DARC служит рецептором для малярийных паразитов *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) – наиболее широко распространенным в мире, он вызывает приблизительно от 70 до 80 миллионов случаев малярии в год. Лица с Даффи-негативным фенотипом устойчивы к инвазии *P. vivax*, и молекулярный механизм, приводящий к фенотипу Fy^(a-b-) у коренных жителей Африки, связан с однонуклеотидными полиморфизмами в позициях -33Т/С или -46Т/С, которые в конечном итоге приводят к отсутствию экспрессии DARC на эритроцитах [30]. Несмотря на то, что *P. vivax* широко распространен в тропическом и субтропическом мире, он практически не вызывает малярию у жителей Западной Африки, где более 95% населения имеют Даффи-отрицательный фенотип. Недавно эта точечная мутация была опи-

сана при гетерозиготности в аллеле FYA в других эндемичных регионах малярии, и до сих пор не понятно, обеспечивает ли она определенную степень защиты от инфекции *P. vivax*. Известно, что у людей, у которых отсутствует экспрессия DARC на эритроидных клетках, снижен риск заражения вирусом иммунодефицита человека-1 (ВИЧ-1) и наблюдается более медленное прогрессирование заболевания [27]. Отрицательный фенотип Даффи очень редко встречается среди европейцев [32]. Таким образом, можно предположить, что повышенное содержание хемокинов CXCL2/Gro-β, CXCL5/ENA-78 и CXCL6/GCP-2 – лигандов DARC у жителей Гвинеиской Республики, по сравнению с жителями Санкт-Петербурга, обусловлено отсутствием у них экспрессии DARC на эритроцитах.

Среди проанализированных нами хемокинов лигандами DARC являются следующие: CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL13/MCP-4, CCL17/TARC, CXCL8/IL-8, CXCL11/I-TAC [25]. Уровень хемокинов CCL7/MCP-3 и CCL17/TARC также повышен в плазме крови жителей Гвинеиской Республики, по сравнению с жителями Санкт-Петербурга. Однако различий в содержании остальных лигандов DARC между двумя обследованными выборками не обнаружено.

Среди исследованных нами хемокинов, помимо трех перечисленных, лигандами DARC являются следующие: CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL13/MCP-4, CCL17/TARC, CXCL8/IL-8, CXCL11/I-TAC [25]. Уровень хемокинов CCL7/MCP-3 и CCL17/TARC также повышен в плазме крови жителей Гвинеиской Республики, по сравнению с жителями Санкт-Петербурга. Однако различий в содержании остальных лигандов DARC между двумя группами обследованных не обнаружено.

Среди исследованных нами хемокинов присутствуют два хемокина кожи: CCL17/TARC и CCL22/MDC, для которых общим рецептором является CCR4. Этот рецептор экспрессируется на поверхности Th2, Т-регуляторных клетках и резидентных Т-клетках кожи [51]. В группе гвинейцев значения хемокинов CCL17/TARC и CCL22/MDC значительно превышали уровни жителей Санкт-Петербурга. Установлено, что при воспалительных реакциях кожи CCL17/TARC секретируют эндотелиальные клетки капилляров кожи, в то время как CCL22/MDC секретируют дермальные клетки кожи. Таким образом, Т-клетки, экспрессирующие CCR4, сначала мигрируют по градиенту CCL17/TARC, а затем направляются в ткани кожи при участии CCL22/

MDC [34]. Еще одним хемокином кожи является CCL27/CTACK, который взаимодействует с рецептором CCR10. В обследованных нами группах различий в уровне этого хемокина не обнаружено. При этом хемокин CCL27/CTACK относится к группе конститутивных хемокинов, тогда как CCL17/TARC и CCL22/MDC являются и воспалительными и конститутивными хемокинами. Обнаруженное повышение концентраций CCL17/TARC и CCL22/MDC в плазме крови гвинейцев может быть связано с большим воздействием на их кожу различных факторов: паразитарной пораженности кожи или повышенной инсоляции, а также различиями в микробиоте кожи у двух разных популяций людей. Для подтверждения или опровержения этих предположений требуются дальнейшие исследования.

При обследовании группы жителей Гвинейской Республики было выявлено увеличение концентрации провоспалительных цитокинов в плазме крови по сравнению с жителями Санкт-Петербурга: TNF α и IL-6. Эти цитокины принимают участие в неспецифической защите организма от бактериальных и вирусных инфекций. Их основные мишени – макрофаги и гранулоциты.

Серьезную проблему для стран Африки представляют вирусные гепатиты. Распространенность гепатитов в Африке одна из самых высоких в мире. Отдельные провинции Гвинейской Республики могут быть отнесены к регионам со средней интенсивностью распространения гепатитов А и В [3]. Частота обнаружения серологических маркеров вирусного гепатита В среди населения Гвинеи достигает 70% и более. Среди обследованных нами жителей Гвинейской Республики у 100% людей были выявлены антитела против вируса гепатита А, у 48% – антитела против вируса гепатита В (анти-НВs) и у 12% – антитела против вируса гепатита С. Полученные нами данные согласуются с опубликованными ранее результатами [5, 9, 13]. Показано, что значимую роль в развитии болезней печени играют цитокины: TNF α , IL-1, IL-6, IL-8. Повышенная выработка этих цитокинов свидетельствует об активности и прогрессировании патологического процесса в печени [6]. В нашем исследовании в плазме крови гвинейцев обнаружены повышенные уровни TNF α , IL-6, что может свидетельствовать о воспалительных процессах в печени.

При анализе полученных данных обращает на себя внимание почти двукратное повышение уровня хемокина CCL20/MIP-3 α в плазме крови гвинейцев по сравнению с жителями Санкт-Петербурга. Роль CCL20/MIP-3 α в развитии про-

цессов иммунорегуляции ткани печени описана давно. Хемокин CCL20/MIP-3 α первоначально был назван LARC (Liver Activation Regulated Chemokine, или хемокин, регулирующий активацию печени), что указывает на его функциональную значимость. Он секретируется преимущественно в печени. Рецептором CCL20/MIP-3 α является CCR6, который широко представлен на активированных Т-лимфоцитах, Т- и В-клетках памяти, Т-регуляторных клетках и Т-хелперах 17 типа [37]. От баланса этих клеток может зависеть ограничение или усиление развития аутоиммунных процессов. При вирусном гепатите С продемонстрирована связь между уровнем CCL20/MIP-3 α и развитием цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [44]. Таким образом, увеличение CCL20/MIP-3 α в плазме крови обследованных жителей Гвинейской Республики может косвенно свидетельствовать о наличии воспалительных процессов в ткани печени.

Хемокины CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 и CXCL11/I-TAC являются IFN γ -зависимым лигандам рецептора CXCR3. Показано их участие в процессах фиброгенеза печени. Например, была подтверждена важная роль лигандов CXCR3 в иммунопатогенезе хронического вирусного гепатита С: концентрация этих хемокинов значительно возрастает и имеет прямую связь со степенью фиброза печени [2, 10, 50]. Повышенные уровни CXCL10/IP-10 в плазме связывают с фиброзом печени, тогда как уровни CXCL9/MIG, согласно некоторым исследованиям, в основном ассоциированы с воспалением [49]. Возможно, повышение уровня CXCL9/MIG в плазме крови жителей Республики Гвинея также может указывать на воспалительные процессы, происходящие в печени. При этом концентрации CXCL10/IP-10 и CXCL11/I-TAC не отличаются в обследованных группах.

Уровень CX3CL1/Fractalkine в 1,3 раза выше в группе гвинейцев по сравнению с жителями Санкт-Петербурга. CX3CL1/Fractalkine является единственным представителем класса CX3C-хемокинов [51]. Этот белок выступает в роли конститутивного и воспалительного хемокина, существует в растворимой и мембранной формах. Растворимый хемокин CX3CL1 обладает мощной активностью хемоаттрактанта для Т-клеток и моноцитов [18]. Установлено, что активность этого хемокина в большой степени зависит от особенности взаимодействия с другими цитокинами и хемокинами [26]. Показано участие CX3CL1/Fractalkine во многих заболеваниях человека: вирусных инфекциях, аутоиммунных, аллергических и онкологических [23, 29, 36], при этом

в литературе часто встречаются противоречивые данные. Возможно, повышенные значения этого хемокина для жителей Гвинеической Республики являются нормой.

Концентрация IL-10 повышена у жителей Гвинеической Республики. Интерлейкин-10 представляет собой плеiotропный цитокин, продуцируемый широким спектром клеток, такими как Т-лимфоциты, В-лимфоциты, тучные клетки, макрофаги. Это противовоспалительный цитокин. Он снижает экспрессию цитокинов Th1, антигенов МНС класса II и костимулирующих молекул на макрофагах, а также увеличивает выживаемость В-клеток, их пролиферацию и продукцию антител.

Концентрация IFN γ и IL-2 у жителей Гвинеической Республики повышена по сравнению с жителями Санкт-Петербурга. TNF α , IL-2, IFN γ имеют решающее значение в защите от внутриклеточных организмов, в том числе вирусов. IL-2 является фактором роста Т-клеток, необходимым для пролиферации Т-клеток и генерации эффекторных клеток и клеток памяти. Важнейшей функцией IL-2 является контроль иммунных реакций и поддержание собственной толерантности, а его отсутствие приводит к дефектному контролю эффекторных клеток и развитию аутоиммунных заболеваний [15]. Известно, что IFN γ принимает участие как в возникновении устойчивости к малярии, так и в иммунопатогенезе этого заболевания [17].

Концентрация CCL23/MIP1F-1 в плазме крови граждан Гвинеической Республики ниже, чем в группе граждан Российской Федерации. Белок проявляет хемотаксическую активность в отношении покоящихся Т-лимфоцитов и моноцитов, минимальную, но значительную активность в отношении нейтрофилов и отрицателен в отношении активированных Т-лимфоцитов. CCL23/MIP1F-1 также является мощным супрессором пролиферации для клеток-предшественников миелоидного ряда в костном мозге [38].

Концентрация CCL24/Eotaxin-2 достоверно ниже в группе жителей Гвинеической Республики. В то же время не обнаружено межгрупповых различий по концентрации CCL11/Eotaxin и CCL26/Eotaxin-3. Эотаксин-3 служат хемотаксисом и активаторами для эозинофилов, базофилов и Т-хелперов 2 типа (Th2), они участвуют в обострении аллергического воспаления, а также в защите от паразитарной инфекции [16, 39]. CCL24/Eotaxin-2 также проявляет хемотаксическую активность в отношении покоящихся Т-лимфоцитов, минимальную активность в отношении нейтрофилов [38]. В кишечнике чело-

века присутствует большое количество эозинофилов, они участвуют в поддержании защитного барьера слизистой оболочки и взаимодействуют с другими иммунными клетками. Было показано, что антигены к гельминтам и простейшим активируют продукцию цитокинов Th2-типа, хемокинов, привлекающих эффекторные клетки, и регуляторных компонентов. После повторного воздействия паразитов и вследствие неспособности хозяина предотвращать или устранять кишечные инфекции, вызванные гельминтами или простейшими, развиваются иммунные реакции с уменьшением провоспалительных и регуляторных цитокинов и хемокинов – это необходимо для частичного контроля паразитов, а также предотвращения чрезмерного повреждения тканей и органов хозяина [31]. В активации эозинофилов участвует IgE. В самом деле, более высокие уровни IgE наблюдаются у коренных жителей Африки. Уровень общего IgE обычно повышен при аллергических заболеваниях, а также при паразитарной инфекции. В то же время было показано, что африканцы, не страдающие ни атопией, ни астмой, ни сенсibilизацией аскаридами, имели средний уровень общего IgE, аналогичный уровням, наблюдаемым у европейцев. Таким образом, гельминтозная инфекция, а не генетические различия, может быть основным определяющим фактором уровня IgE в определенных популяциях [33]. Возможно, отсутствие межгрупповых различий в концентрации CCL11/Eotaxin и CCL26/Eotaxin-3 связано с тем, что эти два хемокина относятся к группе воспалительных хемокинов. В то же время CCL24/Eotaxin-2 принадлежит к группе конститутивных хемокинов. Таким образом, возможно, снижение CCL24/Eotaxin-2 в плазме крови может быть связано с хроническим паразитозом у гвинейцев, что может быть нормой для африканцев. Стоит отметить, что IL-4 способен повышать уровень IgE [28]. Уровень IL-4 в плазме крови гвинейцев достоверно выше по сравнению с группой жителей Санкт-Петербурга. IL-4 стимулирует гуморальное звено иммунитета. Цитокин продуцируется Т-клетками, миелоидными клетками, такими как базофилы и тучные клетки.

В нашем исследовании мы обнаружили, что концентрация MIF в плазме крови почти в 10 раз ниже у жителей Гвинеической Республики по сравнению с гражданами Российской Федерации. MIF (Macrophage Migration Inhibition Factor – фактор, подавляющий миграцию макрофагов) – один из первых открытых цитокинов [20]. Для MIF характерно разнообразие биологических функций, он выступает в роли цитокина, фермента, гормона. Уникальная особенность MIF

состоит в способах реализации его активностей и путей проникновения в клетку [12]. Физиологическая активность MIF очень широка, он является плейотропным универсальным неспецифическим фактором. MIF – единственный цитокин, который находится в клетках практически всех органов и тканей в преформированном состоянии. В основном MIF продуцируют моноциты, макрофаги, Т-лимфоциты, клетки эндотелия, гепатоциты и нейроны. MIF является конститутивно экспрессируемым белком, а также его относят к воспалительным цитокинам. Этот цитокин играет важную роль в патогенезе практически всех заболеваний человека: от воспалительных до онкологических. Причины значительных межпопуляционных различий по концентрации MIF в

плазме крови человека не ясны. Для выяснения причин требуются дальнейшие обследования групп.

Таким образом, в настоящем исследовании впервые определены границы нормы содержания широкого спектра цитокинов/хемокинов в плазме крови жителей Гвинейской Республики. Были выявлены значительные межпопуляционные различия, в том числе среди конститутивных хемокинов. Эти различия могут быть связаны с разной средой обитания, циркуляцией инфекционных заболеваний, содержанием микробиоты кишечника, кожи и слизистых, а также генетическими различиями. Полученные результаты могут стать основой для проведения дальнейших исследований.

Список литературы / References

1. Арсентьева Н.А., Тотолян А.А. Методические сложности при определении содержания некоторых цитокинов в периферической крови практически здоровых лиц // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 763-774. [Arsentieva N.A., Totolian A.A. Methodological issues of determining concentrations of some cytokines in peripheral mblood from healthy individuals. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 763-774. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-763-774.
2. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Жебрун Д.А., Васильева Е.В., Тотолян Арег А. Роль хемокинового рецептора CXCR3 и его лигандов при некоторых иммунопатологических состояниях // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 617-632. [Arsentieva N.A., Semenov A.V., Zhebrun D.A., Vasilyeva E.V., Totolian Areg A. Role of CXCR3 chemokine receptor and its ligands in certain diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 617-632. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-617-632.
3. Буаро М.И., Симонова Е.Г., Покровский В.И. Комплексная оценка эпидемической ситуации в Гвинейской Республике // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2019. Т. 18, № 5. С. 56-62. [Buaro M.I., Simonova E.G., Pokrovsky V.I. Comprehensive assessment of the epidemic situation in the Republic of Guinea. *Epidemiologiya i vaktinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2019, Vol. 18, no. 5, pp. 56-62. (In Russ.)]
4. Долгов В.В., Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная диагностика: Национальное руководство в 2 т. Т. II. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 814 с. [Dolgov V.V., Menshikov V.V. Clinical laboratory diagnostics: National manual in 2 Vol. Vol. II]. Moscow: GEOTAR-Media, 2013. 814 p.
5. Калинина О.В., Личная Е.В., Буаро М.И., Тотолян А.А. Встречаемость маркеров вируса гепатита С у практически здоровых жителей гвинейской республики: пилотное исследование // Инфекция и иммунитет, 2017. Т. 7, № 3. С. 245-250. [Kalinina O.V., Lichnaia E.V., Boiro M.Y., Totolian A.A. The occurrence of the markers of hepatitis C among practically healthy residents of the republic of guinea: a pilot study. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 245-250. (In Russ.)]
6. Кляритская И.Л., Стилиди Е.И. Роль различных цитокинов в фиброгенезе печени при хронических вирусных гепатитах В и С // Крымский терапевтических журнал, 2010. Т. 14, № 1. С. 41-45. [Klyaritskaya I.L., Stilidi E.I. The role of various cytokines in the liver fibrogenesis in chronic viral hepatitis B and C. *Krymskiy terapevticheskikh zhurnal = Crimean Journal of Internal Diseases*, 2010, Vol. 14, no. 1, pp. 41-45. (In Russ.)]
7. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 525-538. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinets I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T cell subsets. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 525-538. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-525-538.
8. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 3. С. 239-250. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinets I.I., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Totolian A.A. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of

t-helpers from peripheral blood. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 239-250. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250.

9. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Эсауленко Е.В., Понятишина М.В., Хамитова И.В., Сафронов В.А., Крицкий А.А., Бумбали С., Барри М.С., Буаро М.Й., Тотолан Арег.А. Распространенность маркеров вируса гепатита В среди пациентов Российско-Гвинейского госпиталя г. Киндия Гвинейской Республики. Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет; под ред. А.Ю. Поповой. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2017. С. 256-263. [Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Ponyatishina M.V., Khamitova I.V., Safronov V.A., Kritskiy A.A., Bumbali S., Barry M.S., Boiro M.Y., Totolian Areg A. Prevalence of hepatitis B virus markers among patients of the Russian-Guinean hospital in Kindia, Republic of Guinea. Current infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnostics and immunity. Ed A.Yu. Popova]. St. Petersburg: Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 2017, pp. 256-263.

10. Семенов А.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Тюленев С.В., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Тотолан А.А. Роль цитокинов и хемокинов в лабораторной диагностике хронического вирусного гепатита С // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. Т. 60, № 8. С. 45-51. [Semenov A.V., Arsentieva N.A., Lubimova N.E., Tulienev S.V., Basina V.V., Esaulenko E.V., Totolyan A.A. The role of cytokines and hemokines in laboratory diagnostic of chronic viral hepatitis C. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics Journal*, 2015, Vol. 60, no. 8, pp. 45-51. (In Russ.)]

11. Смольникова М.В., Коненков В.И. Клиническая иммуногенетика заболеваний человека // Медицинская иммунология, 2001. Т. 3, № 3. С. 379-388. [Smolnikova M.V., Konenkov V.I. Clinical immunogenetics of human disease. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2001, Vol. 3, no. 3, pp. 379-388. (In Russ.)]

12. Суслов А.П., Коноплева М.В., Третьяков О.Ю. Фундаментальная иммунобиология провоспалительных цитокинов и mif // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 1. С. 5-22. [Suslov A.P., Konopleva M.V., Tretyakov O.Yu. Fundamental immunobiology of proinflammatory cytokines and mif. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 1, pp. 5-22. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2006-1-5-22.

13. Эсауленко Е.В., Семенов А.В., Сухорук А.А., Понятишина М.В., Останкова Ю.В., Хамитова И.В., Тотолан Арег.А. Эпидемиология энтеральных гепатитов в странах Африканского континента. Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / под ред. А.Ю. Поповой. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2017. С. 216-224. [Esaulenko E.V., Semenov A.V., Sukhoruk A.A., Ponyatishina M.V., Ostankova Yu.V., Khamitova I.V., Totolian Areg A. Epidemiology of enteral hepatitis in the countries of the African continent. Current infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnostics and immunity. ed A.U. Popova]. St. Petersburg: Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 2017, pp. 216-224.

14. ЮНЕЙДС. Информационный бюллетень – Глобальная статистика по ВИЧ [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <https://www.unaids.org/ru/resources/fact-sheet> (дата обращения: 12.05.2020). [UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics – 2019 fact sheet. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.unaids.org/ru/resources/fact-sheet> (date of the application: 12.05.2020).

15. Abbas A.K., Trotta E.R., Simeonov D., Marson A., Bluestone J.A. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci. Immunol.*, 2018, Vol. 3, Iss. 25, eaat1482. doi: 10.1126/sciimmunol.aat1482.

16. Ahmadi Z., Hassanshahi G., Khorramdelazad H., Zainodini N., Koochakzadeh L. An overlook to the characteristics and roles played by eotaxin network in the pathophysiology of food allergies: allergic asthma and atopic dermatitis. *Inflammation*, 2016, Vol. 39, no. 3, pp. 1253-1267.

17. Andrade B.B., Reis-Filho A., Souza-Neto S.M., Clarêncio J., Camargo L.M., Barral A., Barral-Netto M. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J.*, 2010, Vol. 9, no. 1, p. 13.

18. Bazan J.F., Bacon K.B., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., Greaves D.R., Zlotnik A., Schall T.J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, Vol. 385, no. 6617, pp. 640-644.

19. Bernardini G., Spinetti G., Ribatti D., Camarda G., Morbidelli L., Ziche M., Santoni A., Capogrossi M.C., Napolitano M. I-309 binds to and activates endothelial cell functions and acts as an angiogenic molecule *in vivo*. *Blood*, 2000, Vol. 96, no. 13, pp. 4039-4045.

20. Bloom B.R., Bennet B. Mechanism of reaction *in vitro* associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, 1966, Vol. 153, no. 3731, pp. 80-82.

21. Bromley S.K., Thomas S.Y., Luster A.D. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat. Immunol.*, 2005, Vol. 6, no. 9, pp. 895-901.

22. Chaudhuri A., Nielsen S., Elkjaer M.L., Zbrzezna V., Fang F., Pogo A.O. Detection of Duffy antigen in the plasma membranes and caveolae of vascular endothelial and epithelial cells of nonerythroid organs. *Blood*, 1997, Vol. 89, no. 2, pp. 701-712.

23. Conroy M.J., Lysaght J. CX3CL1 signaling in the tumor microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2020, Vol. 1231, pp. 1-12.

24. Esche C., Stellato C., Beck L.A. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol.*, 2005, Vol. 125, no. 4, pp. 615-628.
25. Gardner L., Patterson A. M., Ashton B.A., Stone M.A., Middleton J. The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, Vol. 32, no. 2, pp. 306-312.
26. Green S.R., Han K.H., Chen Y., Almazan F., Charo I.F., Miller Y.I., Quehenberger O. The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 12, pp. 7412-7420.
27. He W., Neil S., Kulkarni H., Wright E., Agan B.K., Marconi V.C., Dolan M.J., Weiss R.A., Ahuja S.K.. Duffy antigen receptor for chemokines mediates trans-infection of HIV-1 from red blood cells to target cells and affects HIV-AIDS susceptibility. *Cell Host Microbe*, 2008, Vol. 4, no. 1, pp. 52-62.
28. Ho I.C., Miaw S.C. Regulation of IL-4 expression in immunity and diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2016, Vol. 941, pp. 31-77.
29. Julia V., Staumont-Salle D., Dombrowicz D. Role of fractalkine/CX3CL1 and its receptor CX3CR1 in allergic diseases. *Med. Sci. (Paris)*, 2016, Vol. 32, no. 3, pp. 260-266.
30. Langhi D.M. Jr., Bordin J.O. Duffy blood group and malaria. *Hematology*, 2006, Vol. 11, no. 5, pp. 389-398.
31. Lechner C.J., Komander K., Hegewald J., Huang X., Gantin R.G., Soboslay P.T., Agossou A., Banla M., Köhler C. Cytokine and chemokine responses to helminth and protozoan parasites and to fungus and mite allergens in neonates, children, adults, and the elderly. *Immun. Ageing*, 2013, Vol. 10, no. 1, p. 29.
32. Lettow I., Berres M.-L., Schmitz P., Berg T., Neumann U. P., Trautwein C., Wasmuth H.E. A Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) polymorphism that determines pro-fibrotic chemokine serum concentrations is not directly associated with severity of hepatitis C infection. *Hum. Immunol.*, 2011, Vol. 72, no. 3, pp. 273-277.
33. Levin M.E., le Souëf P.N., Motala C. Total IgE in urban Black South African teenagers: the influence of atopy and helminth infection. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2008, Vol. 19, no. 5, pp. 449-454.
34. Mariani M., Lang R., Binda E., Panina-Bordignon P., D'Ambrosio D. Dominance of CCL22 over CCL17 in induction of chemokine receptor CCR4 desensitization and internalization on human Th2 cells. *Eur. J. Immunol.*, 2004, Vol. 34, no. 1, pp. 231-240.
35. Mayr F.B., Spiel A.O., Leitner J.M., Firbas C., Kliegel T., Jilma B. Ethnic differences in plasma levels of interleukin-8 (IL-8) and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). *Transl. Res.*, 2007, Vol. 149, no. 1, pp. 10-14.
36. Nanki T., Imai T., Kawai S. Fractalkine/CX3CL1 in rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.*, 2017, Vol. 27, no. 3, pp. 392-397.
37. Oo Y.H., Shetty S., Adams D.H. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Dig. Dis.*, 2010, Vol. 28, no. 1, pp. 31-44.
38. Patel V.P., Kreider B.L., Li Y., Li H., Leung K., Salcedo T., Nardelli B., Pippalla V., Gentz S., Thotakura R., Parmelee D, Gentz R, Garotta G. Molecular and functional characterization of two novel human C-C chemokines as inhibitors of two distinct classes of myeloid progenitors. *J. Exp. Med.*, 1997, Vol. 185, no. 7, pp. 1163-1172.
39. Rankin S.M., Conroy D.M., Williams T.J. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol. Med. Today*, 2000, Vol. 6, no. 1, pp. 20-27.
40. Reif K., Ekland E.H., Ohl L., Nakano H., Lipp M., Förster R., Cyster J.G. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature*, 2002, Vol. 416, no. 6876, pp. 94-99.
41. Robbiani D.F., Finch R.A., Jäger D., Muller W.A., Sartorelli A.C., Randolph G.J. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell*, 2000, Vol. 103, no. 5, pp. 757-768.
42. Rot A. Contribution of Duffy antigen to chemokine function. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2005, Vol. 16, no. 6, pp. 687-694.
43. Shalekoff S., Schramm D.B., Lassaunière R., Picton A.C., Tiemessen C.T. Differences are evident within the CXCR4-CXCL12 axis between ethnically divergent South African populations. *Cytokine*, 2013, Vol. 61, no. 3, pp. 792-800.
44. Soliman H.H., Nagy H., Kotb N., Alm El-Din M.A. The role of chemokine CC ligand 20 in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Biol. Markers*, 2012, Vol. 27, no. 2, pp. 125-131.
45. van Damme J., Mantovani A. From cytokines to chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2005, Vol. 16, no. 7, pp. 549-551.
46. van Snick J., Houssiau F., Proost P., van Damme J., Renauld J.C. I-309/T cell activation gene-3 chemokine protects murine T cell lymphomas against dexamethasone-induced apoptosis. *J. Immunol.*, 1996, Vol. 157, no. 6, pp. 2570-2576.
47. Willimann K., Legler D.F., Loetscher M., Roos R.S., Delgado M.B., Clark-Lewis I., Baggiolini M., Moser B. The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur. J. Immunol.*, 1998, Vol. 28, no. 6, pp. 2025-2034.
48. Yazdanbakhsh K., Rios M., Storry J.R., Kosower N., Parasol N., Chaudhuri A., Reid M.E. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transfusion*, 2000, Vol. 40, no. 3, pp. 310-320.

49. Zeremski M., Dimova R., Brown Q., Jacobson I.M., Markatou M., Talal A.H. Peripheral CXCR3-associated chemokines as biomarkers of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.*, 2009, Vol. 200, no. 11, pp. 1774-1780.

50. Wasmuth H.E., Lammert F., Matern S. Genetic risk factors for hepatic fibrosis in chronic liver diseases. *Med. Klin. (Munich)*, 2003, Vol. 98, no. 12, pp. 754-762.

51. Zlotnik A., Yoshie O. The chemokine superfamily revised. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 5, pp. 705-716.

Авторы:

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

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

Бацунов О.К. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

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

Authors:

Arsentieva N.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Lyubimova N.E., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Batsunov O.K., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Поступила 10.02.2020

Отправлена на доработку 16.05.2020

Принята к печати 22.05.2020

Received 10.02.2020

Revision received 16.05.2020

Accepted 22.05.2020

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25* С УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *HSPA1B*

**Вавилова Ю.Д., Бойко А.А., Коваленко Е.И., Гречихина М.В.,
Шустова О.А., Ажикина Т.Л., Сапожников А.М.**

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

Резюме. Белки теплового шока (HSPs, heatshock proteins) образуют одну из клеточных молекулярных систем, обладающую шаперонной активностью, направленную на стабилизацию структуры внутриклеточных протеинов, обеспечение устойчивости клеток к стрессу, на ренатурацию неправильно свернутых и элиминацию денатурированных цитоплазматических белков. Учитывая важную роль нарушений уровня экспрессии HSPs в патогенезе целого ряда заболеваний, в нашей работе был проведен поиск ассоциации наличия однонуклеотидных замен (SNPs) в отобранных нами актуальных участках генома с базальным уровнем транскрипционной активности генов группы *HSPA*, а именно *HSPA1A/B*, *HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA6* и *HSPA8* в мононуклеарных лейкоцитах (РВМС) в группе добровольцев из популяции населения средней части России. Исследование проводили с использованием ДНК и РНК, выделенных из лимфоцитов периферической крови 16 доноров. Генотипирование проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием ПЦР продукта. Для оценки уровня экспрессии генов группы *HSPA* проводили синтез кДНК на матрице РНК, выделенной из образцов клеточных фракций РВМС с последующим проведением полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Было проведено генотипирование участков, в которых находятся следующие полиморфизмы: rs400547 (A/G), rs1150793 (G/A), rs707936 (A/G), rs707915 (A/T), rs376510 (T/C), находящиеся в генах *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *MSH5*, *C6orf25* соответственно. Был охарактеризован базальный уровень транскрипции генов конститутивно экспрессирующихся и индуцируемых белков семейства HSP70 и проведен поиск ассоциации их экспрессии с полиморфизмами. Было обнаружено, что в клетках РВМС генотип AG/AA (SNP rs400547), AG/GG (rs1150793), AG (rs707936), TA (rs707915), TC (rs376510) по изученным нами участкам ассоциирован с понижением транскрипции гена *HSPA1B* ($p = 0,02$), по сравнению с гомозиготами: GG (SNP rs400547), AA (rs1150793), GG (rs707936), TT (rs707915), CC (rs376510). Ассоциации указанных полиморфизмов с экспрессией генов *HSPA1A*, *HSPA6* и *HSPA8* выявлено не было. Гены *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25*, в которых присутствуют изученные нами полиморфизмы, находятся в одном локусе вблизи гена *HSPA1B* на 6-й хромосоме. Обнаруженное нами снижение экспрессии гена *HSPA1B* при наличии однонуклеотидных полиморфизмов в близлежащих генах может свидетельствовать о пространственных взаимодействиях этого локуса и локуса гена *HSPA1B* и о том, что изменение генотипа *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25* может повлечь за собой изменение экспрессии близко расположенных генов, которые являются функционально значимыми для клетки.

Ключевые слова: белки теплового шока, ген *HSPA1B*, полиморфизмы

Адрес для переписки:

Вавилова Юлия Дмитриевна
ФГБУН «Институт биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук
140103, Россия, Московская обл., г. Раменское,
ул. Свободы, 8/140.
Тел.: 8 (915) 144-80-12.
E-mail: JuliaTeterina12@gmail.com

Address for correspondence:

Vavilova Yulia D.
M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Russian Academy of Sciences
140103, Russian Federation, Moscow Region, Ramenskoe,
Svobody str., 8/140.
Phone: 7 (915) 144-80-12.
E-mail: JuliaTeterina12@gmail.com

Образец цитирования:

Ю.Д. Вавилова, А.А. Бойко, Е.И. Коваленко,
М.В. Гречихина, О.А. Шустова, Т.Л. Ажикина,
А.М. Сапожников «Анализ ассоциации полиморфизма
генов *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25* с уровнем
экспрессии гена *HSPA1B*» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 4. С. 779-784.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-1629

For citation:

Yu.D. Vavilova, A.A. Boyko, E.I. Kovalenko,
M.V. Grechikhina, O.A. Shustova, T.L. Azhikina,
A.M. Sapozhnikov "Analysis of the association of the
polymorphism of the *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25* genes
with the expression level of the *HSPA1B* gene", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 4, pp. 779-784.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-1629

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF THE POLYMORPHISM OF THE *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25* GENES WITH THE EXPRESSION LEVEL OF THE *HSPA1B* GENE

Vavilova Yu.D., Boyko A.A., Kovalenko E.I., Grechikhina M.V., Shustova O.A., Azhikina T.L., Sapozhnikov A.M.

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

Abstract. Heat shock proteins (HSP, heat shock proteins) form one of the cellular molecular systems with chaperone activity, aimed at stabilizing the structure of intracellular proteins, ensuring the resistance of cells to stress, renaturation of incorrectly folded and elimination of denatured intracellular proteins. Our task was to look for an association between the presence of single nucleotide polymorphisms in selected regions of the genome and the basal level of transcriptional activity of the *HSPA* group genes, namely *HSPA1A/B*, *HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA6* and *HSPA8* in mononuclear leukocytes (PBMC), analyzed in our experiments volunteers from the population of the middle part of Russia in order to analyze the universality of the biological effects of these SNPs. The study was performed on DNA and RNA isolated from peripheral blood lymphocytes of 16 donors. Genotyping was performed by the polymerase chain reaction (PCR) followed by sequencing of the PCR product. To assess the level of gene expression of the *HSPA* group, cDNA was synthesized on an RNA template isolated from PBMC cell fraction samples, followed by real-time polymerase chain reaction. The following types of polymorphisms were genotyped: rs400547 (A/G), rs1150793 (G/A), rs707936 (A/G), rs707915 (A/T), rs376510 (T/C) located in the *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *MSH5*, *C6orf25* genes, respectively. We determined the basal level of transcription of genes of constitutively expressed and inducible proteins of the HSP70 family and searched for the association of their expression with polymorphisms. It was found that in PBMC cells, DNA that has the following genotype: AG/AA (SNP rs400547), AG/GG (rs1150793), AG (rs707936), TAr707915, TC (rs376510), in the regions we studied, is associated with a decrease in the transcription of the *HSPA1B* gene ($p = 0.02$) compared with homozygotes: GG (SNP rs400547), AA (rs1150793), GG (rs707936), TT (rs707915), CC (rs376510). Associations of these polymorphisms with gene expression of *HSPA1A*, *HSPA6* and *HSPA8* have not been identified. The *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25* genes, in which the polymorphisms studied by us are present, are located in the same locus near the *HSPA1B* gene on the 6th chromosome. We found a decrease in *HSPA1B* gene expression in the presence of single nucleotide polymorphisms in nearby genes may indicate spatial interactions of this locus and the *HSPA1B* gene locus, and that a change in the genotype *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25* may entail a change in the expression of closely arranged genes which are functionally significant for the cell.

Keywords: SNPs, heat shock proteins, *HSPA1B* gene

Введение

Белки теплового шока (HSP, heat shock proteins) образуют одну из клеточных молекулярных систем, обладающую шаперонной активностью, направленную на стабилизацию структуры внутриклеточных протеинов, обеспечение устойчивости клеток к стрессу, на ренатурацию неправильно свернутых и элиминацию денатурированных внутриклеточных белков. Однако HSP обладают не только шаперонной активностью, но и участвуют в регуляции сигнальных путей, вовлеченных, в частности, в процессы клеточной дифференцировки, пролиферации и апоптоза [1].

Семейство белков-шаперонов HSP70 составляют несколько высококонсервативных и высокогомологических белков, экспрессия которых выявлена во всех живых организмах. У человека семейство HSP70 включает в себя белки с молекулярной массой 66-78 кДа (номенклатура HUGO Gene Nomenclature Committee). Извест-

но о 15 членах этого семейства, кодируемых разными генами. Несмотря на высокую гомологию внутри семейства белков HSP70, они кодируются разными генами *HSPA*, которые в основном локализованы на разных хромосомах. К экспрессирующимся в клетке конститутивным белкам HSP70 относится преобладающий в клетке в нестрессовых условиях цитозольный белок HSPA8, или Hsc70 (heat shock cognate), с молекулярной массой 73 кДа, продукт гена *HSPA8*. К основным стресс-индуцируемыми белкам семейства HSP70 относят белки HSP70-1 и HSP70-2, кодируемые отдельными генами *HSPA1A* и *HSPA1B*. Данные белки отличаются друг от друга двумя аминокислотами, и в функциональном плане они считаются взаимозаменяемыми [2]. Также идентифицирован минорный стресс-индуцируемый белок HSP70B', кодируемый геном *HSPA6*.

Ранее нами было показано, что в лейкоцитах различного типа различается не только конститутивная транскрипционная активность генов семейства *HSPA1A/B*, *HSPA6* и *HSPA8*, но и из-

менение этой активности в ответ на стресс [3], что свидетельствует о наличии тонкой регуляции экспрессии генов *HSPA* даже на уровне одной клеточной популяции.

В настоящее время показана взаимосвязь между однонуклеотидными полиморфизмами (SNPs) в генах *HSPA1A*, *HSPA1B* и восприимчивостью к инфекционным и воспалительным заболеваниям [4, 5, 6, 7], а также показана взаимосвязь таких SNP с злокачественными новообразованиями [8, 9]. Недавно были опубликованы результаты исследования, в котором с использованием большой выборки из популяции африканского населения были найдены ассоциации SNPs генов *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25*, расположенных в непосредственной близости от генов *HSPA1A/B*, с уровнем экспрессии *HSPA1B* [12].

Основываясь на результатах указанной работы, для нашего исследования были отобраны SNPs, характеризующиеся максимальной ассоциацией с уровнем экспрессии *HSPA1B* (rs400547 (A/G), rs1150793 (G/A), rs707936 (A/G), rs707915 (A/T), rs376510 (T/C)).

Задачей нашей работы был поиск ассоциации между наличием однонуклеотидных замен в отобранных нами участках генома и базальным уровнем транскрипционной активности генов группы *HSPA*, а именно *HSPA1A/B*, *HSPA1A* и *HSPA1B*, *HSPA6* и *HSPA8* в мононуклеарных лейкоцитах (PBMC), в проанализированной в наших экспериментах группе добровольцев из популяции населения средней части России с целью анализа универсальности биологических эффектов указанных SNPs.

Материалы и методы

Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, было получено разрешение локального комитета по биомедицинской этике. Исследование проводили на ДНК и РНК, выделенных из лимфоцитов периферической крови 16 доноров: 7 мужчин и 9 женщин в возрасте 31–75 лет (средний возраст 55,5±3,1 лет). Все доноры – представители Российской популяции, относящиеся к европеоидной расе.

Периферическую кровь собирали закрытым способом в стерильные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта ЭДТА (Vacutube, Италия).

Из образцов периферической крови методом седиментационного разделения клеток на градиенте плотности с помощью коммерческой среды Polymorphprep (Axis-Shield, Швеция) выделяли клеточную фракцию мононуклеарных лейкоцитов (PBMC), включающую преимущественно лимфоциты (до 95%) и моноциты (5%). В каждом образце содержалось около 6 млн клеток. Из образцов клеточных фракций PBMC выделяли тотальную ДНК и РНК коммерческим набором "AllPrep DNA/RNA MiniKit" (Qiagen, США). Измерение концентрации выделенной ДНК и

РНК производили на спектрофотометре BioDrop при длинах волн 260/280 нм (GE Healthcare Life Science, Великобритания). Среднее количество выделенной геномной ДНК варьировало от 1 до 27 мкг, РНК – от 2 до 9 мкг.

Генотипирование проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием ПЦР продукта. ПЦР проводили с использованием ПЦР амплификатора SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Реакционная смесь в объеме 50 мкл содержала 0,5 мкл Q5 High-Fidelity ДНК-полимеразы (New England BioLabs), 10 мкл 5× Reaction Buffer (New England BioLabs), 30,5 мкл воды очищенной от ДНКаз, 0,15 mM смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, по 0,01 mM каждого из праймеров, 10 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили в следующем температурном режиме: 98 °C/30 с – первый цикл, потом 30 циклов: 98 °C/10 с, 67 °C/10 с, 72 °C/20 с, последний цикл – 72 °C/2 мин. Олигонуклеотидные праймеры приведены в таблице 1. Подобранные праймеры были заказаны в фирме «Евроген» (Россия).

Продукты амплификации выделяли очисткой на 1% агарозном геле набором реактивов "Monarch DNA Gel Extraction Kit" (New England BioLabs). Выделенные фрагменты ДНК секвенировали по методу Сэнгера. Полученные данные секвенирования анализировали с помощью программы Chromas 2.6.4.

Для оценки уровня экспрессии генов группы *HSPA* проводили синтез кДНК на матрице РНК, выделенной из образцов клеточных фракций PBMC с последующим проведением полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Синтез кДНК осуществляли с помощью реакции обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы MMLV и вырожденных гексамерных праймеров по протоколу производителя («Евроген», Россия). Гексамерные праймеры (12 пмоль) добавляли в смесь объемом 10 мкл, содержащую 2 мкг тотальной РНК. Смесь нагревали в течение 2 мин при 70 °C, а затем инкубировали во льду 10 мин. Для реакции обратной транскрипции и синтеза кДНК реакционную смесь инкубировали при 42 °C и 70 °C в течение 120 и 15 мин соответственно.

Для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (qRT-PCR) были подобраны специфические праймеры (табл. 1) (5'-3') к отдельным генам группы *HSPA* и референсному гену с помощью программы PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>).

Для проведения qRT-PCR (конечный объем составил 25 мкл) в реакционную смесь добавляли 5 мкл коммерческой реакционной смеси qPCRmix-HSSYBR («Евроген», Россия), 1 мкл 3 mM праймеров (прямого и обратного), 0,5 мкл кДНК и 17,5 мкл воды, очищенной от РНКаз. Реакцию амплификации проводили на приборе LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Германия). Прибор программировали следующим образом:

ТАБЛИЦА 1. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРАЙМЕРЫ К АНАЛИЗИРУЕМЫМ ГЕНАМ ГРУППЫ HSPA
TABLE 1. SPECIFIC PRIMERS FOR THE ANALYZED GENES OF THE HSPA GROUP

Специфические праймеры к анализируемым генам группы HSPA Specific primers for the analyzed genes of the HSPA group		
Ген Gene	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primer
HSPA1A/B	AGGTGCAGGTGAGCTACAAG	CTCGGCGATCTCCTTCATC
HSPA1A	TTTTCCGGTTTCTACATGCAG	CAACTTAAAAAATGGCCTGAGT
HSPA1B	TCTTTAGTATGTTTGTCTTTGAGGTGG	TGGCAGTGTTGATTCAATTTAAAGG
HSPA8	TGCTGCTCTTGGATGCTACT	AAGGTCTGTGTCTGCTTGGT
HSPA6	ACCCAGGTGTATGAGGGTGA	TCTATCTGGGGGACTCCACG
β-актин	CACCACACCTTCTACAATGAG	GTCTCAAACATGATCTGGGTC
Последовательности специфичных праймеров к участкам генов, в которых находятся исследуемые нами однонуклеотидные замены The sequence of specific primers to the regions of the genes in which the studied single nucleotide polymorphisms are located		
SNP	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primer
rs400547	TTTACTCGTGGGTGAGGCTGT	GAAGGGACAGTGAGGATGAGG
rs1150793	ACGCACTGGTGACATCATCTC	AAATTACCCTGCCGATTCCT
rs707936	TGGGGAAAAGGAAGAGAATGACA	GACGAGAAGCCAACCCAGTA
rs707915	TCCCAGGAGCACAGAGAG	CATAAGGCAGAGGGGAGATCT
rs376510	TAGCAAGCACAGAGCAGGTG	TCTATCTCCAGCCCCATGTT

прединкубация (95 °C, 5 мин), затем 40 циклов, в которые входят режимы денатурации (95 °C, 10 с), отжига праймеров (60 °C, 10 с) и удлинения ДНК (72 °C, 10 с). Каждый образец для амплификации был внесен в трех повторах. Уровень значений экспрессии интересующих генов для каждого донора в клеточных фракциях нормировали по референсному гену β-actin («ген домашнего хозяйства»).

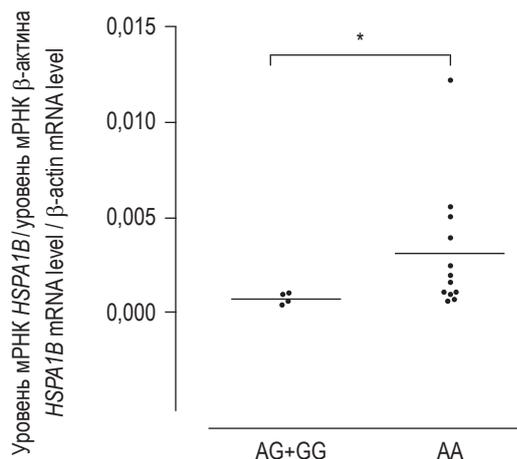


Рисунок 1. Ассоциация генотипов AG/GG (rs1150793) и AA (rs1150793) гена MSH5 с базальным уровнем транскрипции гена HSPA1B
Примечание. * – $p < 0,05$.

Figure 1. Association of genotypes AG/GG (rs1150793) and AA (rs1150793) of the MSH5 gene with a basal level of transcription of the HSPA1B gene.

Note. *, $p < 0.05$.

Статистическая обработка данных

Степень накопления мРНК анализировали по алгоритму с определением коэффициента эффективности отжига праймеров. Для анализа использовали программы LightCycler 480 версия SW1.5.1, Exor4, LinRegPCR, LC480 Conversion. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного пакета GraphPad Prism 6. Для сравнения выборок использовали критерий Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Было проведено генотипирование участков, в которых находятся следующие полиморфизмы: rs400547 (A/G), rs1150793 (G/A), rs707936 (A/G), rs707915 (A/T), rs376510 (T/C), находящиеся в генах *CLIC1*, *MSH5*, *Sborf26*, *MSH5*, *Sborf25* соответственно. Данные полиморфизмы были выбраны на основе исследований, в которых была показана ассоциация этих нуклеотидных полиморфизмов с уровнем экспрессии гена *HSPA1B* в африканской популяции [12]. Нами были изучены 16 представителей российской популяции, относящихся к европеоидной расе.

В основном выборка оказалась достаточно однородной, у большинства принявших участие в исследовании добровольцев не было обнаружено ни одного из указанных полиморфизмов (табл. 2). У трех человек выявлена гетерозиготность по всем исследуемым полиморфным нуклеотидам. Еще один индивид имел гомозиготные однонуклеотидные замены, rs400547 (A/A),

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ, В КОТОРЫХ НАХОДЯТСЯ ИССЛЕДУЕМЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ, И РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗМЕРЕНИЯ СРЕДНЕГО УРОВНЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ ГРУППЫ *HSPA*

TABLE 2. GENOTYPING RESULTS OF THE STUDIED POLYMORPHISMS AND THE RESULTS OF MEASURING THE AVERAGE LEVEL OF TRANSCRIPTION OF GENES OF THE *HSPA* GROUP

Генотип Genotype <i>CLIC1</i> rs400547 Intron	Генотип Genotype <i>MSH5</i> rs1150793 Intron	Генотип Genotype <i>C6orf26</i> rs707936 Downstream	Генотип Genotype <i>MSH5</i> rs707915 Intron	Генотип Genotype <i>C6orf25</i> rs376510 Promoter	Кол-во доноров Number of donors (N)
G/G	A/A	G/G	T/T	C/C	12
A/G	A/G	A/G	T/A	C/T	3
A/A	G/G	A/G	T/A	T/T	1
Средний уровень транскрипции генов группы <i>HSPA</i> (относительно уровня транскрипции β-актина) The average level of transcription of genes of the <i>HSPA</i> group (relative to the level of transcription of β -actin)					
Генотип Genotype <i>CLIC1</i> rs400547 Intron	<i>HSPA1A/B</i>	<i>HSPA1A</i>	<i>HSPA1B</i>	<i>HSPA6</i>	<i>HSPA8</i>
G/G	0,0084 ($\pm 0,0016$)	0,0347 ($\pm 0,006$)	0,0031 ($\pm 0,0009$)	0,0062 ($\pm 0,002$)	0,0949 ($\pm 0,022$)
A/G	0,0074 ($\pm 0,0061$)	0,0266 ($\pm 0,02$)	0,0010 ($\pm 0,0003$)	0,0058 ($\pm 0,0045$)	0,0717 ($\pm 0,05$)
A/A	0,0020	0,0058	0,0006	0,0029	0,0253

rs1150793 (G/G), rs376510 (T/T), отличные от гомозигот, выявленных у большинства исследованных доноров. В участках rs707936 и rs707915 у этого индивида были выявлены гетерозиготные замены (A/G) и (A/T) соответственно.

Нами было проведено определение базального уровня транскрипции генов конститутивно экспрессирующихся и индуцируемых белков семейства HSP70, и проведен поиск ассоциации их экспрессии с полиморфизмами. Было обнаружено, что в клетках РВМС ДНК, имеющая следующий генотип: AG/AA (SNP rs400547), AG/GG (rs1150793), AG (rs707936), TArS707915, TC (rs376510), по изученным нами участкам ассоциирована с понижением транскрипции гена *HSPA1B* ($p = 0,02$), по сравнению с гомозиготами (GG (SNP rs400547), AA (rs1150793), GG (rs707936), TT (rs707915), CC (rs376510)) (рис. 1). Ассоциации указанных полиморфизмов с экспрессией генов *HSPA1A*, *HSPA6* и *HSPA8* выявлено не было. По данным исследований, суммированных Национальным центром биотехнологической информации США (1000 Genomes, TOPMED), частота встречаемости указанных полиморфизмов составляет 11-12% (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). В нашей небольшой группе представителей российской популяции для rs707936 и rs707915 она составляет 12,5%, а для rs400547, rs1150793 и rs376510 – 15,6%. Неболь-

шие отличия от опубликованных данных могут объясняться малой выборкой.

Гены *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25*, в которых присутствуют изученные нами полиморфизмы, находятся в одном локусе вблизи гена *HSPA1B* на 6-й хромосоме. Обнаруженное нами снижение экспрессии гена *HSPA1B* при наличии однонуклеотидных полиморфизмов в близлежащих генах может свидетельствовать о пространственных взаимодействиях этого локуса и локуса гена *HSPA1B* и о том, что изменение генотипа *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25* может повлечь за собой изменение экспрессии близко расположенных генов, которые являются функционально значимыми для клетки.

Интересно, что у всех доноров, прослеживается следующая закономерность: если обнаруживается однонуклеотидная замена в одном из изученных нами генов *CLIC1*, *MSH5*, *C6orf26*, *C6orf25*, то замены наблюдаются и в остальных. Таким образом, можно предположить наличие некоего гаплотипа, сочетающего указанные полиморфизмы, ассоциированные со снижением экспрессии *HSPA1B*.

В заключение можно отметить, что сравнение изложенных результатов с данными, полученными в недавно опубликованной работе наших коллег [12], указывает на определенную универсальность биологических эффектов проанализированных SNPs.

Список литературы / References

- Alfirevic A., Mills T., Harrington P., Pinel T., Sherwood J., Jawaid A., Smith J.C., March R.E., Barratt B.J., Chadwick D.W., Kevin Park B., Pirmohamed M. Serious carbamazepine-induced hypersensitivity reactions associated with the HSP70 gene cluster. *Pharmacogenet. Genomics*, 2006, Vol. 16, no. 4, pp. 287-296.
- Bogunia-Kubik K., Koscińska K., Suchnicki K., Lange A. HSP70-hom gene single nucleotide (+2763 G/A and +2437 C/T) polymorphisms in sarcoidosis. *Int. J. Immunogenet.*, 2006, Vol. 33, no. 2, pp. 135-140.

3. Boyko A.A., Azhikina T.L., Streltsova M.A., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I. HSP70 in human polymorphonuclear and mononuclear leukocytes: comparison of the protein content and transcriptional activity of HSPA genes. *Cell Stress Chaperones*, 2017, Vol. 22, no. 1, pp. 67-76.
4. Helmbrecht K., Zeise E., Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Proliferation*, 2000, Vol. 33, no. 6, pp. 341-365.
5. Kampinga H.H., Hageman J., Vos M.J., Kubota H., Tanguay R.M., Bruford E.A., Cheetham M.E., Chen B., Hightower L.E. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*, 2009, Vol. 14, no. 1, pp. 105-111.
6. Kee C., Cheong K.Y., Pham K., Waterer G.W., Temple S.E. Genetic variation in heat shock protein 70 is associated with septic shock: Narrowing the association to a specific haplotype. *Int. J. Immunogenet.*, 2008, Vol. 35, no. 6, pp. 465-473.
7. Martin A.M., Nolan D., Gaudieri S., Almeida C.A., Nolan R., James I., Carvalho F., Phillips E., Christiansen F.T., Purcell A.W., McCluskey J., Mallal S. Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B*5701 and a haplotypic Hsp70-Hom variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, Vol. 101, no. 12, pp. 4180-4185.
8. Maugeri N., Radhakrishnan J., Knight J.C. Genetic determinants of HSP70 gene expression following heat shock. *Hum. Mol. Genet.*, 2010, Vol. 19, no. 24, pp. 4939-4947.
9. Shibata T., Arisawa T., Tahara T., Yoshioka D., Maruyama N., Fujita H., Kamiya Y., Nakamura M., Nagasaka M., Iwata M., Takahama K., Watanabe M., Hirata I., Nakano H. Protective role of genetic polymorphism of heat shock protein 70-2 for gastric cancer risk. *Dig. Dis. Sci.*, 2009, Vol. 54, no. 1, pp. 70-74.
10. Spagnolo P., Sato H., Marshall S.E., Antoniou K.M., Ahmad T., Wells A.U., Ahad M.A., Lightman S., du Bois R.M., Welsh K.I. Association between heat shock protein 70/Hom genetic polymorphisms and uveitis in patients with sarcoidosis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2007, Vol. 48, no. 7, pp. 3019-3025.
11. Temple S.E.L., Cheong K.Y., Ardlie K.G., Sayer D., Waterer G.W. The septic shock associated HSPA1B1267 polymorphism influences production of HSPA1A and HSPA1B. *Intensive Care Med.*, 2004, Vol. 30, no. 9, pp. 1761-1767.
12. Ucisik-Akkaya E., Davis C.F., Gorodezky C., Alaez C., Dorak M.T. HLA complex-linked heat shock protein genes and childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility. *Cell Stress Chaperones*, 2010, Vol. 15, no. 5, pp. 475-485.

Авторы:

Вавилова Ю.Д. – техник-лаборант лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Бойко А.А. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Коваленко Е.И. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Гречихина М.В. – младший научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Шустова О.А. – младший научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Ажикина Т.Л. – д.б.н., руководитель лаборатории регуляторной транскриптомики ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Сапожников А.М. – д.б.н., профессор, руководитель лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Vavilova Yu.D., Laboratory Technician, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Boyko A.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kovalenko E.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Grechikhina M.V., Junior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Shustova O.A., Junior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Azhikina T.L., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Regular Transcriptomics, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Sapozhnikov A.M., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 02.11.2018

Отправлена на доработку 19.11.2018

Принята к печати 11.12.2018

Received 02.11.2018

Revision received 19.11.2018

Accepted 11.12.2018

СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ЖЕНЩИН ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА «ПРОВАГ»

Козлов В.А.¹, Борисов А.Г.², Савченко А.А.^{2,3}, Кондаков А.Е.²,
Кудрявцев И.В.^{4,5}

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

² ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

³ ФГАУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

⁴ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁵ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Лактобактерии широко применяются в клинической практике как пробиотики, биологически активные добавки и пробиотические продукты функционального питания. Некоторые пробиотики можно рассматривать как бактериальные вакцины, на действие которых формируется иммунный ответ с выработкой специфических антител. Целью исследования явилось изучение состояния клеточного и гуморального звеньев иммунитета у женщин при использовании пробиотических штаммов лактобактерий. В исследование включена 31 здоровая женщина в возрасте 25-45 лет. В качестве источника комплекса пробиотических лактобактерий использовался препарат «Проваг» (RU 77.99.11.003.E.003746.02.11 от 11.02.2011, в 1 капсуле содержится 10^9 *Lactobacillus gasseri* 57C, *Lactobacillus fermentum* 57A и *Lactobacillus plantarum* 57B). Препарат применялся в течение 30 суток из расчета 1 капсула в день. Исследование состояния иммунной системы проводилось дважды: перед началом приема препарата и через 30 дней. Исследование популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии при использовании прямой иммунофлуоресценции. Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М, G в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментного метода. Для определения специфических антител использовали реакцию пассивной гемагглютинации с эритроцитарным диагностикумом. В качестве источника антигена использовали комплекс пробиотических лактобактерий *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus plantarum* соответствующие препарату «Проваг». Установлено, что через 30 суток приема пробиотического препарата «Проваг» у здоровых женщин в периферической крови повышается количество Т- и В-лимфоцитов. Увеличение содержания Т-клеток осуществляется за счет фракции Т-хелперов. Повышение в уровнях Т-хелперов и В-лимфоцитов приводит к стимуляции гуморального звена иммунной системы, что реализуется в увеличении концентрации IgA и IgG в сыворотке крови. С помощью реакции пассивной гемагглютинации установлено, что у 90,0% здоровых женщин через 30 суток приема препарата «Проваг» в крови повышается содержание специфических IgA.

Ключевые слова: иммунитет, Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты, В-лимфоциты, иммуноглобулины, пробиотик «Проваг»

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Академика Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-68.
Факс: 8 (812) 234-94-89.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-68-68.
Fax: 7 (812) 234-94-89.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

В.А. Козлов, А.Г. Борисов, А.А. Савченко, А.Е. Кондаков, И.В. Кудрявцев «Состояние иммунной системы у женщин при использовании пробиотика «Проваг» // Медицинская иммунология, 2020, Т. 22, № 4. С. 785-790. doi: 10.15789/1563-0625-SOT-1572
© Козлов В.А. и соавт., 2020

For citation:

V.A. Kozlov, A.G. Borisov, A.A. Savchenko, A.E. Kondakov, I.V. Kudryavtsev "State of the immune system in women using the "Provag" probiotic", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 785-790. doi: 10.15789/1563-0625-SOT-1572
DOI: 10.15789/1563-0625-SOT-1572

STATE OF THE IMMUNE SYSTEM IN WOMEN USING THE “PROVAG” PROBIOTIC

Kozlov V.A.^a, Borisov A.G.^b, Savchenko A.A.^{b, c}, Kondakov A.E.^b, Kudryavtsev I.V.^{d, e}

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

^b Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

^c Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

Abstract. Lactobacilli are widely used in clinical practice as probiotics, biologically active additives and probiotic products for functional nutrition. Some probiotics can be considered as bacterial vaccines due to induction of immune response, accompanied by production of specific antibodies. The aim of the present study was to evaluate the state of cellular and humoral immunity in women by using probiotic strains of lactobacilli. The study included 31 healthy women aged 25-45 years. As a source of probiotic lactobacterial complex, we used the “Provag” preparation (RU 77.99.11.003.E.003746.02.11 of 11.02.2011, 1 capsule contains 10^9 *Lactobacillus gasseri* 57C, *Lactobacillus fermentum* 57A и *Lactobacillus plantarum* 57B). The drug was used for 30 days, at a rate of one capsule per day. The immune system was examined twice: before administering the drug and after 30 days of treatment. The study of blood lymphocyte populations and subpopulations was performed by flow cytometry using direct immunofluorescence technique. The concentration of IgA, IgM, IgG in blood serum was determined using enzyme immunoassay. To determine specific antibodies, we used passive hemagglutination reaction with erythrocyte diagnosticum. The complex of probiotic lactobacilli *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum* corresponding to the “Provag” preparation was used as a source of antigen. It has been revealed that the number of T and B lymphocytes in peripheral blood increased after 30 days of treatment with the probiotic preparation “Provag” in healthy women. Elevated contents of T cells was due to the T helper cell fraction. Increased levels of T helpers and B lymphocytes were associated with stimulation of humoral immunity, as evidenced by increasing concentration of IgA and IgG in blood serum. By means of passive hemagglutination reaction, we have found that 90% of healthy women showed increased concentrations of specific IgA in blood after 30 days of treatment with “Provag” preparation.

Keywords: immunity, T helpers, cytotoxic T lymphocytes, B lymphocytes, immunoglobulins, probiotic “Provag”

Введение

Мукозальный иммунитет и микрофлору слизистых влагалища можно рассматривать как единую структурно-функциональную систему организма, защищающую слизистые от патогенных микроорганизмов [2, 3]. Из более 50 видов микроорганизмов, извлеченных из вагинального тракта, наиболее распространенными являются лактобактерии, играющие ключевую роль в поддержании здоровья и профилактики инфекций. Лактобактерии за счет способности образовывать молочную кислоту, перекись водорода, лизоцим и другие вещества угнетают развитие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [5, 13].

Лактобактерии широко применяются в клинической практике как пробиотики, биологически активные добавки, так и как пробиотические продукты функционального питания. Доказана их клиническая эффективность [10, 12, 14]. Однако механизм действия применения пробиотиков остается до настоящего времени непонятен

и не может быть объяснен только механическим замещением микрофлоры.

Между тем действие некоторых пробиотиков можно рассматривать как иммунизацию, формирующую иммунный ответ с выработкой специфических антител, прежде всего секреторных IgA. Секреторный IgA – основной иммуноглобулин секретов слизистых оболочек, представляет собой димерную форму со связанными за счет секреторного компонента Fc-фрагментами. За счет этого взаимодействие IgA с системой комплемента и клетками иммунной системы выражено слабо. Микрофлора стимулирует продукцию секреторного IgA, который помогает поддерживать пространственную сегрегацию микрофлоры без ущерба для метаболической активности микробов. То есть IgA является своеобразной защитой нормальной микрофлоры, в том числе и лактобактерий, от иммунной системы организма хозяина [9, 11]. Имеются отдельные экспериментальные исследования, показывающие влияние на иммунитет пробиотиков на основе лактобакте-

рий. Так, в работе Wen K. и соавт. (2011) показано, что при введении штаммов *Lactobacillus acidophilus* гнотобиотическим свиньям изменяется фенотипический репертуар $\gamma\delta$ T-лимфоцитов [15]. В исследовании Kandasamy S. и соавт. (2014) установлено, что у пробиотико-колонизированных, вакцинированных *Lactobacillus rhamnosus* свиней повышается активность В-лимфоцитов и уровень секреторного IgA на слизистой кишечника [6]. При этом отсутствуют исследования изменений иммунной системы у людей при воздействии пробиотических штаммов лактобактерий, в том числе при терапии, направленной на нормализацию микрофлоры влагалища.

Целью исследования явилось изучение состояния клеточного и гуморального звеньев иммунитета у женщин при использовании пробиотических штаммов лактобактерий.

Материалы и методы

В исследование включена 31 здоровая женщина в возрасте 25–45 лет. В качестве источника комплекса пробиотических лактобактерий использовался препарат «Проваг» (RU 77.99.11.003.E.003746.02.11 от 11.02.2011, в 1 капсуле содержится 10^9 *Lactobacillus gasseri* 57C, *Lactobacillus fermentum* 57A и *Lactobacillus plantarum* 57B). Препарат применялся в течение 30 суток из расчета 1 капсула в день. Исследование состояния иммунной системы проводилось дважды: перед началом приема препарата и через 30 дней.

Исследование популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии при использовании прямой иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-TexasRed-X) и PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) в следующих панелях: CD45-FITC/CD4-PE/CD8-ECD/CD3-PC5 и CD45-FITC/CD56-PE/CD19-ECD/CD3-PC5. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [4]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [8]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) центра коллективного пользования КНЦ СО РАН [7]. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 лимфоцитов.

Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М, G в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментного метода (АО «Вектор-Бест», Россия).

Для определения специфических антител использовали реакцию пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА) с эритроцитарным диагностикумом, приготовленным согласно технологии, предложенной Анненковым В.В. и соавт. (2003) [1]. В качестве источника антигена использовали комплекс пробиотических лактобактерий *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus plantarum*, соответствующих препарату «Проваг». Для постановки РПГА использовали набор микротитратора Такачи. Реакцию проводили в U-образных планшетах, титруя от 1:2 до 1:128. За титр сыворотки принимали последнее разведение сыворотки, в котором имеется положительная реакция. В процессе анализа проводился контроль диагностикума на отсутствие спонтанной агглютинации и контроль активности.

Все исследования были выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 года, а также «Правилами надлежащей клинической практики», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 1 апреля 2016 года № 200н.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты и обсуждение

При исследовании клеточного звена иммунной системы обнаружено, что у женщин через 30 дней приема препарата «Проваг» в периферической крови повышается процентное количество $CD3^+$ и $CD19^+$ лимфоцитов (табл. 1). Повышение относительного содержания $CD3^+$ лимфоцитов сопровождается увеличением их абсолютного уровня (табл. 2). Кроме того, через 30 дней приема препарата «Проваг» у женщин повышается относительное и абсолютное содержание $CD3^+CD4^+$ клеток, что приводит к увеличению коэффициента $CD4^+/CD8^+$.

Со стороны гуморального звена иммунной системы через 30 дней приема препарата «Проваг» наблюдается увеличение концентрации IgA и IgG в сыворотке крови (табл. 3). С помощью РПГА нами исследованы титры антител к *Lactobacillus* в сыворотке крови у женщин до начала и через 30 дней приема препарата «Проваг». Обнаружено, что у 30,0% (9 чел.) титр антител к лактобактериям через 30 дней приема препарата «Проваг» повышается в 3 раза, у 36,7% (11 чел.) – в 2 раза, у 23,3% (7 чел.) – в 1,5 раза. У 10,0%

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ДИНАМИКЕ ПРИМЕНЕНИЯ «ПРОВАГ», Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. INDICATORS OF THE CELLULAR IMMUNITY IN THE DYNAMICS OF THE USE OF "PROVAG", Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Исходные Initial	30-й день 30 th day	p
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л Leukocytes, × 10 ⁹ /l	6,25 (4,75-7,50)	6,70 (5,85-7,95)	
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	39,0 (33,0-45,2)	39,5 (34,1-42,0)	
Лимфоциты, × 10 ⁹ /л Lymphocytes, × 10 ⁹ /l	2,19 (1,63-3,12)	2,52 (1,84-3,01)	
CD3 ⁺ , %	67,0 (62,1-73,2)	75,4 (69,4-84,6)	< 0,001
CD16/56 ⁺ , %	18,1 (15,0-23,9)	15,5 (12,4-19,9)	
CD19 ⁺ , %	14,0 (11,0-18,1)	16,7 (14,4-22,3)	< 0,01

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ДИНАМИКЕ ПРИМЕНЕНИЯ «ПРОВАГ», Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. INDICATORS OF THE T CELL IMMUNITY IN THE DYNAMICS OF THE USE OF "PROVAG", Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Исходные Initial	30-й день 30 th day	p
CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /l	1,48 (1,16-1,93)	1,72 (1,42-2,24)	< 0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	39,1 (33,0-44,1)	46,0 (40,5-47,8)	< 0,01
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD4 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,88 (0,70-1,27)	1,08 (0,78-1,40)	< 0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	28,1 (22,3-31,8)	28,8 (24,4-31,8)	
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD8 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,57 (0,45-0,77)	0,70 (0,52-0,84)	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,35 (1,12-1,58)	1,60 (1,31-1,96)	< 0,05

(3 чел.) женщин не выявляется изменений титра антител к *Lactobacillus* в сыворотке крови.

Анализ изменений в фенотипическом составе лимфоцитов периферической крови у женщин через 30 дней приема препарата «Проваг» позволяет отметить следующее. Через 30 суток профилактического приема препарата «Проваг» у здоровых женщин повышается содержание Т- и В-лимфоцитов в периферической крови. При этом увеличение количества Т-лимфоцитов осуществляется за счет субпопуляции Т-хелперов. При исследовании состояния гуморального звена иммунной системы обнаружено, что у женщин через 30 дней приема препарата «Проваг» повышается концентрация IgA и IgG в сыворотке крови. На этом фоне у большинства женщин (90% — 28 чел.) возрастает титр антител к *Lactobacillus*. В целом реакция со стороны иммунной системы у здоровых женщин через 30 суток приема препарата «Проваг» характеризуется изменениями в показателях и клеточного, и гуморального

звеньев иммунитета. Повышение количества *Lactobacillus* в кишечнике приводит к повышению количества Т-хелперов и В-лимфоцитов в периферической крови. Развитие подобной реакции со стороны клеточного иммунитета является классической при введении пробиотика и приводит к стимуляции гуморального иммунитета.

Таким образом, через 30 суток приема пробиотического препарата «Проваг» у здоровых женщин в периферической крови повышается количество Т- и В-лимфоцитов. Увеличение содержания Т-клеток осуществляется за счет субпопуляции Т-хелперов. Повышение в уровнях Т-хелперов и В-лимфоцитов приводит к стимуляции гуморального звена иммунной системы, что реализуется в увеличении концентрации IgA и IgG в сыворотке крови. С помощью реакции пассивной гемагглютинации установлено, что у 90,0% здоровых женщин через 30 суток приема препарата «Проваг» в крови повышается содержание специфических IgA.

ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИЯ ОСНОВНЫХ КЛАССОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В ДИНАМИКЕ ПРИМЕНЕНИЯ «ПРОВАГ»,
Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. CONCENTRATION OF THE MAIN IMMUNOGLOBULIN CLASSES IN THE DYNAMICS OF OF THE USE OF "PROVAG",
Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Исходные Initial	30-й день 30 th day	p
IgA, g/l	1,73 (1,17-3,80)	2,50 (2,20-3,00)	< 0,01
IgM, g/l	0,92 (0,31-2,00)	1,10 (0,85-3,00)	
IgG, g/l	10,30 (7,30-15,00)	15,25 (14,35-18,40)	< 0,01

Все это свидетельствует о том, что высокие дозы естественных штаммов лактобактерий вызывают активацию адаптивного иммунитета, проявляющуюся в стимулировании функциональной активности В-лимфоцитов, вырабатывающих специфические IgA, что способствует повышению концентрации секреторного специфического IgA на слизистых и создает преимущественные условия для колонизации слизистой лактобактериями. Гипотетически данный механизм представляется следующим образом. Как известно, в распознавании антигенов бактерий в ЖКТ ключевая роль отводится Т-хелперам 3 типа (регуляторные Т-лимфоциты). Они сдерживают активацию эффекторных иммунных клеток, но при последующем повышении пула специфических В-клеток. На это указывают данные увеличения числа CD4⁺ лимфоцитов и повышения

числа В-клеток после применения «Провага». Реакция на «пробиотиковую иммунизацию» развивается как классический вторичный иммунный ответ с образованием антител к лактобактериям, так как в препарате «Проваг» используются натуральные штаммы лактобактерий в высокой дозе. При этом за счет выработки антител, относящихся к секреторному IgA, осуществляется защита лактобактерий от воздействия компонентов иммунной системы (нейтрофилы, макрофаги, комплемент и пр.) с успешной их колонизацией на слизистой влагалища. Препарат «Проваг» с высоким содержанием лактобактерий может успешно использоваться для естественного восстановления микрофлоры влагалища и кишечника за счет физиологического механизма действия по типу «пробиотической иммунизации».

Список литературы / References

1. Анненков В.В., Лещук С.И., Круглова В.А., Мазяр Н.Л., Попкова С.М., Шмелева Е.А. Способ приготовления эритроцитарного антигенного диагностикума. Патент РФ № 2202801. Оpubл. 20.04.2003. Бюл. № 11. 6 с. [Annenkov V.V., Leshchuk S.I., Kruglova V.A., Mazyar N.L., Popkova S.M., Shmeleva E.A. Method of preparation of erythrocyte antigenic diagnosticum. Russian Patent No. 2202801, Print 20.04.2003, Bulletin No. 11, 6 p.]
2. Борисов А.Г., Савченко А.А., Тихонова Е.П., Сергеева И.В., Каспаров Э.В., Кудрявцев И.В., Арутюнян С.С. Состояние иммунной системы при использовании пробиотических лактобактерий в комплексной терапии папилломавирусной инфекции // Казанский медицинский журнал, 2017. Т. 98, № 1. С. 20-26. [Borisov A.G., Savchenko A.A., Tikhonova E.P., Sergeeva I.V., Kasparov E.V., Kudryavtsev I.V., Arutyunyan S.S. The state of immune system during the use of probiotic lactobacilli in complex treatment of papillomavirus infection. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2017, Vol. 98, no. 1, pp. 20-26. (In Russ.)]
3. Караулов А.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В., Алешкин А.В., Метельская В.А., Гречишниква О.Г., Байракова А.Л., Егорова Е.А., Урбан Ю.Н., Евсегнеева И.В. Микрофлора, колонизационная резистентность слизистых и мукозальный иммунитет // Иммунология, 2015. Т. 36, № 5. С. 290-295. [Karaulov A.V., Afanasyev S.S., Aleshkin V.A., Voropaeva E.A., Afanasyev M.S., Nesvizhsky Yu.V., Aleshkin A.V., Metelskaya V.A., Grechishnikova O.G., Bayrakova A.L., Egorova E.A., Urban Yu.N., Evsegneeveva I.V. Microflora, colonization resistance of the mucous and mucosal immunity. *Immunologiya = Immunology*, 2015, Vol. 36, no. 5, pp. 290-295. (In Russ.)]
4. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
5. Новокшонов А.А., Соколова Н.В. Физиологические функции лактобактерий в организме и эффективность их применения в составе пробиотиков в педиатрической практике // Эффективная фармакотерапия, 2012. № 53. С. 52-57. [Novokshonov A.A., Sokolova N.V. Physiological functions of lactobacilli in the body and the effectiveness of their use in the composition of probiotics in pediatric practice. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2012, no. 53, pp. 52-57. (In Russ.)]

6. Kandasamy S., Chattha K.S., Vlasova A.N., Rajashekara G., Saif L.J. Lactobacilli and Bifidobacteria enhance mucosal B cell responses and differentially modulate systemic antibody responses to an oral human rotavirus vaccine in a neonatal gnotobiotic pig disease model. *Gut Microbes*, 2014, Vol. 5, no. 5, pp. 639-651.
7. Luider J., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *Lab. Hematol.*, 2004, Vol. 10, pp. 102-108.
8. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.
9. Mathias A., Pais B., Favre L., Benyacoub J., Corthésy B. Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria. *Gut Microbes*, 2014, Vol. 5, no. 6, pp. 688-695.
10. Segal J.P., Oke S., Hold G.L., Clark S.K., Faiz O.D., Hart A.L. Systematic review: ileoanal pouch microbiota in health and disease. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 2018, Vol. 47, no. 4, pp. 466-477.
11. Suzuki T., Aina A., Hasegawa H. Functional and structural characteristics of secretory IgA antibodies elicited by mucosal vaccines against influenza virus. *Vaccine*, 2017, Vol. 35, no. 39, pp. 5297-5302.
12. Tan Y., Leonhard M., Moser D., Ma S., Schneider-Stickler B. Inhibitory effect of probiotic lactobacilli supernatants on single and mixed non-albicans *Candida* species biofilm. *Arch. Oral Biol.*, 2018, Vol. 85, pp. 40-45.
13. Taverniti V., Guglielmetti S. Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*. *Front. Microbiol.*, 2012, Vol. 3, pp. 392.
14. van Pijkeren J.P., Barrangou R. Genome editing of food-grade lactobacilli to develop therapeutic probiotics. *Microbiol. Spectr.*, 2017, Vol. 5, no. 5.
15. Wen K., Li G., Zhang W., Azevedo M.S., Saif L.J., Liu F., Bui T., Yousef A., Yuan L. Development of $\gamma\delta$ T cell subset responses in gnotobiotic pigs infected with human rotaviruses and colonized with probiotic lactobacilli. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2011, Vol. 141, no. 3-4, pp. 267-275.

Авторы:

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; профессор кафедры медицинской биологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Кондаков А.Е. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Medical Biology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kondakov A.E., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 10.09.2019
Отправлена на доработку 10.11.2019
Принята к печати 10.01.2020

Received 10.09.2019
Revision received 10.11.2019
Accepted 10.01.2020

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ ВЛИЯНИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА КОНЦЕНТРАЦИИ ИНГИБИТОРОВ ГИДРОЛАЗ И ЛАКТОФЕРРИНА ПРИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЯХ У ВЗРОСЛЫХ

Костинов М.П.^{1,2}, Зорин Н.А.³, Кажарова С.В.¹, Зорина В.Н.⁴

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

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

³Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

⁴ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель исследования – изучение влияния иммуномодуляторов Бронхо-Ваксом[®], вакцины иммуновак-ВП4 и полиоксидония на кинетику концентраций ингибиторов гидролаз и лактоферрина в сыворотке крови при лечении внебольничной пневмонии (ВП). В исследование включен 71 пациент с ВП в возрасте от 18 до 70 лет. Больные были распределены на 4 группы: I гр. (15 чел.) – контроля, пациентам проводилась только базисная антибактериальная и симптоматическая терапия по стандартной схеме лечения без применения иммуномодуляторов; II гр. (19 чел.) – пациенты дополнительно получали Бронхо-Ваксом (препарат был назначен с момента поступления в стационар – 1 цикл 30 дней, а затем 2 цикла по 10 дней с интервалом в 20 дней); в III гр. (20 чел.) – полиоксидоний (препарат назначался с первого дня пребывания в стационаре в дозе 6 мг в/м, один раз в сутки ежедневно в течение 3 дней, далее через день курсом 10 инъекций); в IV гр. (17 чел.) – вакцина иммуновак-ВП4 (препарат назначался перорально 4 мл и интраназально 2 капли на 1, 4, 7, 10, 13, 19, 25, 31 день). Вакцина состоит из антигенов условно-патогенных микроорганизмов (поликомпонентная смесь водорастворимых антигенов микробных клеток *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*). Содержание ингибиторов гидролаз α 2-макроглобулина (МГ) и α 1-антитрипсина (АТ) определяли методом количественного ракетного иммуноэлектрофореза с использованием исследовательских тест-систем, а уровень лактоферрина (ЛФ) оценивался методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем. Эти показатели изучали в сыворотке крови до назначения лечения, на 2-й, 13-й и 60-й дни наблюдения. Показано, что назначение

Адрес для переписки:

Зорина Вероника Николаевна
ФГБУН «Институт токсикологии
Федерального медико-биологического агентства»
192019, Россия, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1
Тел.: 8 (812) 372-51-23.
E-mail: nilimmun@yandex.ru

Address for correspondence:

Zorina Veronika N.
Institute of Toxicology, Federal Medical-Biological Agency
192019, Russian Federation, St. Petersburg,
Bekhterev str., 1
Phone: 7 (812) 372-51-23.
E-mail: nilimmun@yandex.ru

Образец цитирования:

М.П. Костинов, Н.А. Зорин, С.В. Кажарова,
В.Н. Зорина «Сравнительный эффект влияния
иммуномодуляторов на концентрации ингибиторов
гидролаз и лактоферрина при внебольничных
пневмониях у взрослых» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 4. С. 791-798.
doi: 10.15789/1563-0625-CEO-1548

© Костинов М.П. и соавт., 2020

For citation:

M.P. Kostinov, N.A. Zorin, S.V. Kazharova, V.N. Zorina
“Comparative effect of immunomodulators on the contents of
hydrolase inhibitors and lactoferrin in community-acquired
pneumonia in adults”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 4,
pp. 791-798.
doi: 10.15789/1563-0625-CEO-1548

DOI: 10.15789/1563-0625-CEO-1548

иммуномодуляторов в комплексе с антибактериальной терапией у больных с ВП в разной степени может оказывать действие на кинетику реактантов острой фазы воспаления. Эффект Бронхо-Ваксома соответствует классическим канонам ответа на воспалительный процесс — активация блока позитивных острофазовых реактантов (α 1-антитрипсин и лактоферрин) на фоне торможения (блокирования) панели негативных реактантов острой фазы воспаления (α 2-макроглобулин). Полиоксидоний оказывает заметное влияние лишь на нейтрофилы, секретирующие лактоферрин. Иммуновак-ВП4 способствует лишь кратковременной секреции данного белка. Можно предположить, что активация ингибиторов гидролаз и лактоферрина на фоне назначения иммуностропных препаратов способствует усилению клинического эффекта терапии с уменьшением тяжести и продолжительности симптомов, а также снижению вероятности обострения хронических заболеваний, уменьшению объема принимаемых лекарственных средств.

Антибактериальная терапия не оказывает существенного влияния на кинетику реактантов острой фазы воспаления при пневмонии. Назначение иммуномодуляторов в комплексе со стандартной базисной терапией в разной степени оказывает влияние на воспалительный процесс, что впоследствии ведет к улучшению прогноза исхода заболевания.

Ключевые слова: иммуномодуляторы, ингибиторы гидролаз, лактоферрин, внебольничная пневмония

COMPARATIVE EFFECT OF IMMUNOMODULATORS ON THE CONTENTS OF HYDROLASE INHIBITORS AND LACTOFERRIN IN COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN ADULTS

Kostinov M.P.^{a, b}, Zorin N.A.^c, Kazharova S.V.^a, Zorina V.N.^d

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

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

^c Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Training of Physicians, Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

^d Institute of Toxicology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The purpose of our study was to examine the effect of immunomodulators (broncho-vaxom, immunovac-VP4 vaccine and polyoxidonium) upon the kinetics of serum hydrolase inhibitors and lactoferrin in the treatment of community-acquired pneumonia (CAP). The study included 71 CAP patients at the age of 18 to 70 years. The patients were divided into 4 groups: Group I (15 people) was a control group treated with basic antibacterial and symptomatic therapy, according to the standard treatment regimen, without use of immunomodulators; the patients from group II (19 patients) were additionally administered broncho-vaxom (the drug was prescribed upon admission: 1 course over 30 days, then 2 rounds for 10 days each, with an interval in 20 days); group III (20 cases) contained the patients who additionally received polyoxidonium (the drug was prescribed from the 1st day of hospitalization, 6 mg daily i/m for 3 days, then 10 injections over 10 days); group IV (17 cases): Immunovac-VP4 vaccine was administered orally 4 ml and intranasally 2 drops on days 1, 4, 7, 10, 13, 19, 25, 31, along with antibacterial and symptomatic therapy. This vaccine consists of antigens from opportunistic microorganisms (a multicomponent mixture of water-soluble antigens of *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *E. coli*). Serum concentrations of α 2-macroglobulin and α 1-antitrypsin hydrolase inhibitors were determined by the method of quantitative immunoelectrophoresis using the research test systems; lactoferrin (LF) levels were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay using commercial test systems. These indicators were studied in blood serum before treatment, on the 2nd, 13th, and 60th days of observation.

It was shown that administration of immune modulators combined with antibiotic therapy in patients with CAP can affect the kinetics of acute phase inflammatory proteins. The effect of broncho-vaxom corresponds to the classical pathway of the response to inflammatory process, i.e., activation of complex of positive acute phase reactants (α 1-antitrypsin and lactoferrin) and inhibition (blocking) of negative acute phase reactants (α 2-macroglobulin). Polyoxidonium has a noticeable effect only upon neutrophils secreting lactoferrin. Immunovac-VP4 promotes only short-term secretion of this protein. One may assume that activation of hydrolase inhibitors and lactoferrin after use of immunotropic drugs enhances clinical effect of therapy, with decreased severity and duration of symptoms, as well as lower exacerbation risk of chronic diseases and lesser volume of drug intake. Antibacterial therapy does not significantly affect the kinetics of acute phase inflammation reactants in patients with CAP. Administration of immunomodulators in combination with standard basic therapy may affect the inflammatory process to different degree, thus, in turn, leading to improved prognosis in this disease.

Keywords: immunomodulators, hydrolase inhibitors, lactoferrin, community-acquired pneumonia

Введение

Основным средством при лечении пневмонии до настоящего времени остается антибиотикотерапия. Наряду с ней, перспективно применение иммуномодуляторов, мобилизующих иммунную систему на подавление воспалительного процесса [12]. Практически все возбудители пневмонии для вторжения в организм используют гидролазы, разрушающие сурфактант и легочную ткань. Массированная гибель клеток при развитии воспалительного процесса масштабирует гидролитический потенциал инвазии за счет выделения ферментов из разрушенных органелл. Следовательно, интенсивность воспаления напрямую зависит от баланса системы гидролазы/ингибиторы [11]. Наиболее мощными и универсальными ингибиторами гидролаз являются α ₂-макроглобулин (МГ) и α ₁-антитрипсин (АТ), относящийся к группе ингибиторов сериновых протеиназ – серпинов. Оба белка обладают также широким спектром регуляторных свойств, в том числе иммуномодуляторных [9]. МГ защищает организм посредством блокирования гидролаз микроорганизмов, связывает и транспортирует инфекционные патогены к клеткам иммунной системы, а также доставляет антигены от антиген-презентирующих клеток к лимфоцитам в реакции кооперации иммунокомпетентных клеток. Кроме того, данный белок является основным транспортером и презентатором иммунорегуляторных соединений, таких как цитокины и гормоны. Комплексы МГ с транспортируемыми агентами имеют экстремально короткий период полувыведения – 1-3 минуты. Это позволяет оперативно реагировать на возникающие в организме ситуации посредством быстрой доставки в клетки-мишени сигнальных молекул [3]. Комплексы АТ с гидролазами выводятся из циркуляции часами и ответ на их поступление в клетки-мишени носит отсроченный характер [10]. Различие между МГ и

серпинами состоит в том, что первый лишь связывает, но не блокирует активный центр гидролазы, тогда как серпины полностью устраняют литическую активность связанных ферментов [3]. Лактоферрин (ЛФ), помимо выраженных иммуномодулирующих свойств, обладает универсальными антимикробными свойствами. Он способен блокировать активность практически всех известных инфекционных патогенов – бактерий, вирусов и грибов [7].

Современные отечественные иммуномодуляторы, применяемые для лечения пневмонии, имеют широкий спектр действия на патогенную микрофлору за счет активации обоих звеньев иммунитета, а также свойств детоксикантов и антиоксидантов [1, 2, 4, 5, 6]. Однако их влияние на систему ингибиторов гидролаз и лактоферрина до сих пор не изучалось.

Цель исследования – изучение влияния иммуномодуляторов вакцины иммуновак-ВП4, Бронхо-Ваксом® и полиоксидоний на кинетику концентраций ингибиторов гидролаз и лактоферрина в сыворотке крови при лечении пневмонии.

Материалы и методы

В исследовании участвовал 71 больной пневмонией в возрасте от 18 до 70 лет (средний возраст 53,15±3,18), все пациенты были распределены в 4 группы. В группу контроля вошли 15 больных, которым проводилась только базисная антибактериальная и симптоматическая терапия по стандартной схеме лечения, без применения иммуномодуляторов. II группа (19 пациентов) дополнительно получали Бронхо-Ваксом (препарат был назначен с момента поступления в стационар – 1 цикл 30 дней, а затем 2 цикла по 10 дней с интервалом в 20 дней). III группа (20 пациентов) получала полиоксидоний (препарат назначался с первого дня пребывания в стационаре, в дозе 6 мг в/м, один раз в сутки ежедневно в течение 3 дней, далее через день курсом 10 инъек-

ций). IV группа (17 пациентов) получала вакцину иммуновак-ВП4 (препарат назначался перорально 4 мл и интраназально 2 капли на 1, 4, 7, 10, 13, 19, 25, 31 день). Вакцина состоит из антигенов условно-патогенных микроорганизмов, поликомпонентная (смесь водорастворимых антигенов микробных клеток *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*). В основе механизма действия препарата лежит активация ключевых эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета. Препарат активирует фагоцитарную активность макрофагов, корректирует количество и функциональную активность субпопуляций лимфоцитов (CD3, СЕМ, CD8, CD 16, CD72), программирует пролиферацию и активацию CD4 Т-лимфоцитов по Th1-пути, увеличивает продукцию $IFN\gamma$ и $IFN\alpha$, корректирует синтез изотипов иммуноглобулинов в сторону снижения IgE и повышения IgG, IgA, sIgA. Вызывает выработку антител к 4 видам условно-патогенных микроорганизмов, антигены которых входят в состав препарата, а также к другим видам (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и др.) за счет наличия в используемых антигенах широкой перекрестной протективной активности. Клинический эффект проявляется в уменьшении частоты острых инфекций, сокращении продолжительности их течения, уменьшении тяжести симптомов, а также снижении вероятности обострения хронических заболеваний, уменьшении объема принимаемых лекарственных средств (инструкция по применению препарата). Кроме того, в исследование была включена группа из 9 практически здоровых лиц аналогичного возраста в ходе плановой диспансеризации. Все они подписали информированное согласие на участие в исследовании, получение образцов для коллекций осуществлялось по стандартному протоколу этического комитета.

Содержание МГ, АТ и ЛФ определялось в сыворотке крови до назначения лечения, на 2-й, 13-й и 60-й дни наблюдения. Образцы крови были получены из локтевой вены, сыворотка отделена центрифугированием (3000 об/мин), образцы замораживались до проведения исследования коллекции. Концентрация МГ и АТ определялась методом количественного ракетного иммуноэлектрофореза, с использованием исследовательских тест-систем, разработанных на базе НИЛ иммунологии НГИУВ. Уровень ЛФ оценивался методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), а также оборудования и программного обеспечения для ИФА (Bio-Rad, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы InStat-II (GraphPad, США); статистически значимым считали $p < 0,05$. Значимость различий между параметрами рассчитывали по критерию Anova.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным результатам (табл. 1), средние сывороточные концентрации изучаемых показателей в группе сравнения (больные пневмонией без назначения иммуномодуляторов) статистически не различались на всем протяжении лечения. Они не имели отличий и от соответствующих показателей контрольной группы.

Столь же стабильны были концентрации МГ, независимо от применяемого иммуномодулятора.

Применение Бронхо-Ваксома приводило к достоверно значимому увеличению концентраций альфа1-АТ с 1 до 13 суток от начала лечения, то есть в течение острой фазы воспалительного процесса. К 60 суткам терапии концентрация данного белка уже не отличалась от показателей группы сравнения и контрольной группы.

Полиоксидоний не оказывал какого-либо влияния на уровни АТ в сыворотке крови вне зависимости от этапа лечения, как и вакцина иммуновак-ВП4.

Концентрация ЛФ под действием Бронхо-Ваксома практически удваивалась уже через сутки от начала лечения. После этого она постепенно снижалась до нормализации к 60 суткам, но даже на 13 сутки достоверно превышала показатели группы сравнения.

Применение полиоксидония характеризовалось достижением максимума уровня ЛФ на 2-13 сутки лечения с последующим снижением до показателей контрольной группы к 60 суткам.

Использование иммуновака-ВП4 вызывало единичный относительно небольшой прирост концентрации ЛФ на вторые сутки, достоверно превышавший его уровни в остальные сроки наблюдений.

При классической схеме воспалительной реакции активируется биосинтез позитивных реактантов острой фазы воспаления и блокируются гены негативных реактантов. Признанными представителями первой группы являются серпины и ЛФ, тогда как МГ – типичный негативный реактант. Инициатором реакции является трансформирующий фактор роста 1β (TGF- 1β), который связывается МГ и доставляется в клетки-мишени. Там он активирует гены основных провоспалительных цитокинов – интерлейкина- 1β (IL-1) и фактора некроза опухолей- α (TNF α).

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОСТРОФАЗНЫХ БЕЛКОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЕЙ, ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В ПРОГРАММУ ЛЕЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ

TABLE 1. DYNAMICS OF INDICATORS OF ACUTE PHASE PROTEINS, WHICH HAVE IMMUNOMODULATING ACTIVITY IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH PNEUMONIA, AFTER INCLUSION IN TREATMENT OF VARIOUS IMMUNOMODULATORS

Показатели Indicators	Дни обследований Examination days				Достоверность динамических наблюдений по Анова Reliability of dynamic observations by Anova
	1	2	13	60	
Доноры (здоровые) / Donors (healthy) (n = 9)					
α₂-макроглобулин (г/л) α ₂ -macroglobulin (g/l)	2,05±0,09				
α₁-антитрипсин (г/л) α ₁ -antitrypsin (g/l)	2,44±0,11				
Лактоферрин (мг/л) Lactoferrin (mg/l)	0,77±0,10				
Контроль (больные + лечение без иммуномодуляторов) (n) Control (patients + treatment without immunomodulators) (n)					
α₂-макроглобулин (г/л) α ₂ -macroglobulin (g/l)	2,17±0,17 (15)	1,81±0,13 (9)	2,18±0,14 (12)		
α₁-антитрипсин (г/л) α ₁ -antitrypsin (g/l)	2,43±0,17	2,07±0,07	2,23±0,10		
Лактоферрин (мг/л) Lactoferrin (mg/l)	0,77±0,11	0,73±0,15	0,86±0,10		
Больные + лечение + Бронхо-Ваксом (n) / Patients + treatment + Broncho-Vax (n)					
α₂-макроглобулин (г/л) α ₂ -macroglobulin (g/l)	2,36±0,21 (19)	2,22±0,21 (18)	2,36±0,20 (17)	1,94±0,09 (15)	
α₁-антитрипсин (г/л) α ₁ -antitrypsin (g/l)	2,92±0,21 p ₁ = 0,09 p ₂ = 0,006	2,74±0,19 p ₁ = 0,023 p ₂ = 0,016	2,79±0,21 p ₁ = 0,068 p ₂ = 0,015	2,17±0,1	Anova F = 2,98 p = 0,038
Лактоферрин (мг/л) Lactoferrin (mg/l)	1,43±0,23 p = 0,066	1,35±0,15 p = 0,016 p ₁ = 0,015	1,18±0,16 p = 0,09 p ₂ = 0,003	0,59±0,08	Anova F = 4,51 p = 0,006
Больные + лечение + Полиоксидоний (n) / Patients + treatment + Polyoxidonium (n)					
α₂-макроглобулин (г/л) α ₂ -macroglobulin (g/l)	1,90±0,12 (20)	2,01±0,11 (20)	1,93±0,10 (17)	1,99±0,12 (18)	
α₁-антитрипсин (г/л) α ₁ -antitrypsin (g/l)	2,29±0,14	2,41±0,12	2,28±0,09	2,46±0,13	
Лактоферрин (мг/л) Lactoferrin (mg/l)	1,32±0,11 p = 0,0041	1,70±0,14 p = 0,0002 p ₃ = 0,043 p ₁ = 0,0003	1,63±0,22 p = 0,011 p ₁ = 0,01 p ₂ < 0,0001	0,49±0,06	Anova F = 15,3 p < 0,0001
Больные + лечение + Иммуновак-ВП4 (n) / Patients + treatment + Immunovac-VP4 (n)					
α₂-макроглобулин (г/л) α ₂ -macroglobulin (g/l)	1,93±0,13 (17)	1,98±0,11 (12)	2,16±0,09 (15)	2,07±0,17 (5)	
α₁-антитрипсин (г/л) α ₁ -antitrypsin (g/l)	2,41±0,11	2,42±0,18	2,40±0,11	2,34±0,14	
Лактоферрин (мг/л) Lactoferrin (mg/l)	0,74±0,09	1,18±0,19 p ₃ = 0,032 p ₁ = 0,09	0,89±0,08	0,61±0,11	Anova F = 2,98 p = 0,041

Примечание. p – достоверность различий в показателях в сравнении с донорами; p₁ – сравнение с контролем (аналогичный день обследования); p₂ – сравнение с 60 днем; p₃ – сравнение 1-2 день.

Note. p, reliability of differences in indicators in comparison with donors; p₁, comparison with control (similar day of examination); p₂, comparison with day 60; p₃, comparison of 1-2 days.

Оба цитокина связываются МГ и доставляются в клетки-мишени, где они активируют панель генов позитивных реактантов острой фазы воспаления (серпинов, фибриногена, С-реактивного белка, ЛФ, орозомукоида, гаптоглобина) и блокируют панель генов негативных реактантов (МГ, альбумина, плазминогена и трансферрина) [8].

При классической (стандартной) схеме лечения пневмонии эта система регуляции не включается. Следовательно, процесс воспаления локализуется на местном уровне и практически сводится к активации мукозального иммунитета, возможности которого противостоят инвазии весьма ограничены. Отсюда напрашивается применение иммуномодуляторов, способных привлечь на борьбу с инфекцией всю мощь системы иммунитета на организменном уровне.

Концентрация МГ при использовании всех трех иммуномодуляторов не отличалась от нормы. Казалось бы, это дает основание допускать ареактивность данного универсального транспортера и презентатора биорегуляторов в системе крово-лимфообращения в ответ на локальное воспаление тканей легких. Между тем, хорошо известно, что гидролазы микроорганизмов способны при пневмонии проникать в кровь, провоцируя выброс свободных радикалов. Поврежденные ими молекулы МГ утрачивают способность реагировать с рецепторами и находятся в циркуляции до момента обнаружения соответствующими антителами. Поскольку они способны транспортировать гидролазы, ограниченно или полностью сохраняющие исходную активность, такие комплексы сами по себе становятся патогенетически значимым фактором [3]. Это дает основание предполагать, что блокирование биосинтеза МГ при пневмонии все же имеет место, а стабильность концентраций его в крови объясняется накоплением медленно утилизируемых поврежденных молекул.

Концентрация АТ в сыворотке крови значимо и относительно долгосрочно повышается лишь при использовании Бронхо-Ваксома. Следовательно, лишь данный иммуномодулятор спосо-

бен перевести активацию защитных систем организма с местного на системный уровень.

Все три иммуномодулятора способствуют увеличению концентраций ЛФ в сыворотке крови при пневмонии. Бронхо-Ваксом уже через сутки увеличивает его уровень в сыворотке крови более чем в три раза. Вряд ли это связано со столь быстрой активацией его биосинтеза. Скорее всего, имеет место секреция белка из нейтрофилов, где он депонирован. В последующий период секреция ЛФ несомненно дополняется за счет его биосинтеза. Сходная по составу вакцина иммуновак-ВП4 действует иначе – она способствует кратковременной отсроченной секреции ЛФ, но не стимулирует его биосинтез. Действие полиоксидония первоначально проявляется в умеренной, но статистически достоверной секреции ЛФ, в дальнейшем усиленным стабильным биосинтезом этого белка.

Из всех использованных иммуномодуляторов лишь действие Бронхо-Ваксома отвечает классическим канонам ответа на воспалительный процесс – активация блока позитивных острофазовых реактантов (АТ и ЛФ) на фоне торможения (блокирования) панели негативных реактантов острой фазы воспаления (МГ). Полиоксидоний оказывает заметное влияние лишь на нейтрофилы, секретирующие ЛФ. Иммуновак-ВП4 способствует лишь кратковременной секреции данного белка.

Заключение

Традиционная схема лечения пневмонии не оказывает существенного влияния на кинетику реактантов острой фазы воспаления, обладающих иммунорегуляторными свойствами, способными запустить ответ иммунной системы на уровне крово-лимфообращения. Иммуномодулятором, включающим типичный ответ организма по острофазовому типу в ответ на локальную воспалительную реакцию (пневмонию), является Бронхо-Ваксом. Полиоксидоний и особенно иммуновак-ВП4 относительно умеренно влияют лишь на нейтрофилы.

Список литературы / References

1. Аллергология и иммунология: национальное руководство / под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 656 с. [Allergology and immunology: national manual. Ed. R.M. Khaitov, N.I. Ilyina]. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 656 p.
2. Зорин Н.А., Зорина В.Н. Эволюция белков семейства макроглобулинов – от бактерий до приматов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 2017. Т. 53, № 6. С. 389-397. [Zorin N.A., Zorina V.N. Evolution of the macroglobulin protein family: from bacteria to primates. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2017, Vol. 53, no. 6, pp. 389-397. (In Russ.)]

3. Коровкина Е.С., Костинов М.П., Кажарова С.В. Возможности использования иммуномодуляторов в комплексной терапии внебольничных пневмоний // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2017. Т. 4. С. 101-111. [Korovkina E.S., Kostinov M.P., Kazharova S.V. Possibilities of use of immune modulators in complex therapy of community-acquired pneumonias. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, Vol. 4, pp. 101-111. (In Russ)].
4. Костинов М.П., Озерецковский Н.А. Клинико-иммунологическая эффективность иммунобиологических препаратов. М.: Миклош, 2004. 256 с. [Kostinov M.P., Ozeretskovsky N.A. Clinical and immunological efficacy of immunobiological preparations]. Moscow: Miklosh, 2004. 256 p.
5. Респираторная медицина: руководство: в 3 т. / под ред. А.Г. Чучалина. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Литтера, 2017. Т. 2. 544 с. [Chuchalin A.G. Respiratory medicine: manual: in 3 vol. Ed. A.G. Chuchalin. 2nd ed., rev. and suppl.]. Moscow: Littera, 2017, Vol. 2. 544 p.
6. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система, справочное издание). Выпуск XVII. / под ред. А.Г. Чучалина, В.В. Яснецова. М.: Видокс, 2016. 1045 с. [Federal leadership about the use of medicines (formular system, reference publication). Iss. XVII. Ed. A.G. Chuchalin, V.V. Yasnetsov]. Moscow: Vidoks, 2016. 1045 p.
7. André G., Politano W., Mirza S., Converso T.R., Ferraz L.F., Leite L.C., Darrieux M. Combined effects of lactoferrin and lysozyme on *Streptococcus pneumoniae* killing. *Microb. Pathog.*, 2015, Vol. 89, pp. 7-17.
8. Chung C.L., Chen C.H., Sheu J.R., Chen Y.C., Chang S.C. Proinflammatory cytokines, transforming growth factor-beta1, and fibrinolytic enzymes in loculated and free-flowing pleural exudates. *Chest*, 2005, Vol. 128, no. 2, pp. 690-697.
9. Meyerholz D., Lambertz A., Reznikov L., Ofori-Amanfo G., Karp P., McCray P., Welsh M., David A. Stoltz D. Immunohistochemical detection of markers for translational studies of lung disease in pigs and humans. *Toxicol. Pathol.*, 2016, Vol. 44, no. 3, pp. 434-441.
10. Subramaniyam D., Steele C., Köhnlein T., Welte T., Grip O., Matalon S., Janciauskiene S. Effects of alpha 1-antitrypsin on endotoxin-induced lung inflammation *in vivo*. *Inflamm. Res.*, 2010, Vol. 59, no. 7, pp. 571-578.
11. Umeki S., Niki Y., Soejima R. Elastase/anti-elastase systems in pulmonary diseases. *Am. J. Med. Sci.*, 1988, Vol. 296, no. 2, pp. 103-106.
12. Wu Q., di Jiang D., Minor M., Martin R.J., Chu H.W. *In vivo* function of airway epithelial TLR2 in host defense against bacterial infection. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2011, Vol. 300, no. 4, pp. 579-586.

Авторы:

Костинов М.П. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры эпидемиологии ИПО ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва, Россия

Authors:

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Vaccinoprophylaxis and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Epidemiology Department, Institute of Vocational Education, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Зорин Н.А. — д.б.н., заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Zorin N.A., PhD, MD (Biology), Head, Central Research Laboratory, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Training of Physicians, Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Кажарова С.В. — аспирант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Kazharova S.V., Postgraduate Student, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Зорина В.Н. — д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Zorina V.N., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Institute of Toxicology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 15.06.2018
Отправлена на доработку 22.06.2018
Принята к печати 30.07.2018

Received 15.06.2018
Revision received 22.06.2018
Accepted 30.07.2018

ЗНАЧИМОСТЬ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ОБЕСПЕЧЕНИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ ОБЩЕВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Сизякина Л.П., Андреева И.И., Данилова Д.И.

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

Резюме. Стандартом лечения ОВИН является регулярное пожизненное использование заместительной терапии иммуноглобулинами класса G, однако не во всех случаях ее применения достигается полный контроль в отношении стабилизации очагов хронической инфекции. Цель – анализ изменений в клеточном компоненте адаптивного и врожденного иммунного ответа в зависимости от эффективности заместительной терапии пациентов с инфекционным фенотипом ОВИН. Группу наблюдения составили 15 человек с ОВИН, с раннего детства имеющие острые респираторные инфекции затяжного характера с последующим развитием осложнений и необходимостью продолжительного применения антибиотиков.

В среднем в возрасте после 15 лет интенсивность инфекционной манифестации недостаточности антителопродукции составляла 6-8 раз в течение года. После верификации диагноза пациенты получали заместительную терапию вначале в дозе насыщения, а после стабилизации IgG на уровне 7-8 г/л – ежемесячно в поддерживающей дозе. Анализировали клиническое течение заболевания в течение полного года заместительной терапии и оценивали показатели клеточного звена иммунитета.

У всех пациентов через год терапии, соответствующей клиническими рекомендациями, отмечено улучшение показателей качества жизни, уменьшение случаев рецидивов бактериальных инфекций. В то же время 40% из них продолжали болеть в среднем $5,4 \pm 1,1$ раза в год и имели потребность в продолжительных курсах антибиотикотерапии. Анализ результатов оценки иммунного статуса не выявил статистически значимых различий в насыщении плазмы IgG между группами пациентов с различной эффективностью лечения: 8,7 (8-9) г/л и 9,1 (8,5-10,5) г/л, при $p = 0,5$. Отличительные признаки связаны с характеристикой клеточных компонентов и проявляются тем, что при меньшем эффекте ВВИГ-терапии больше относительное количество Т-эффекторов, содержащих литические гранулы гранзима В и число $CD14^+CD284^+$ моноцитов, ниже способность к спонтанной продукции активных форм кислорода нейтрофилами, меньше циркулирующих в периферическом кровотоке $CD16^+$ натуральных киллеров.

Полученные данные иллюстрируют информативность мониторинга не только уровня сывороточных иммуноглобулинов G класса, но и параметров клеточного звена иммунного ответа. Такой

Адрес для переписки:

Андреева Ирина Ивановна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону,
Нахичеванский пер., 29.
Тел.: 8 (863) 263-44-41.
E-mail: iai3012@rambler.ru

Address for correspondence:

Andreeva Irina I.
Rostov State Medical University
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don,
Nakhichevansky lane, 29.
Phone: 7 (863) 263-44-41.
E-mail: iai3012@rambler.ru

Образец цитирования:

Л.П. Сизякина, И.И. Андреева, Д.И. Данилова
«Значимость клеточного звена иммунной системы в обеспечении эффективности заместительной терапии у больных общевариабельной иммунной недостаточностью» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 799-804.
doi: 10.15789/1563-0625-IOC-1989

© Сизякина Л.П. и соавт., 2020

For citation:

L.P. Sizyakina, I.I. Andreeva, D.I. Danilova "Importance of cellular immunity link for efficiency of replacement therapy in common variable immune deficiency", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 799-804.
doi: 10.15789/1563-0625-IOC-1989

DOI: 10.15789/1563-0625-IOC-1989

анализ может иметь существенное значения в качестве прогностического критерия эффективности ВВИГ-терапии. Снижение ряда параметров клеток врожденного иммунитета служит основанием для формулирования концепции комбинированного лечения и применения средств, воздействующих на свойства иммунокомпетентных клеток.

Ключевые слова: ОВИН, заместительная терапия ВВИГ, клетки иммунной системы

IMPORTANCE OF CELLULAR IMMUNITY LINK FOR EFFICIENCY OF REPLACEMENT THERAPY IN COMMON VARIABLE IMMUNE DEFICIENCY

Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Danilova D.I.

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

Abstract. Lifetime use of IgG replacement therapy is the standard of CVID treatment. However, full control over stabilization of chronic infection loci is not always achieved, even if this therapy is continuously applied. The purpose of this study was to carry out comparative analysis of changes in cellular component of adaptive and innate immune response, depending on effectiveness of replacement therapy of patients with infectious CVID phenotype. The observation group consisted of 15 patients with CVID who were diagnosed since early childhood in 100% of cases. They had prolonged respiratory infections followed by the development of complications requiring continuous treatment with antibiotics.

After reaching mean age of 15 years old, the intensity of infection-associated antibody deficiency was 6-8 times per year. After verification of the diagnosis, the patients received replacement therapy, first at the saturation dose, and, after stabilization of IgG at the level of 7-8 g/l, at the monthly maintenance dose. The clinical course of the disease was traced during a full year of replacement therapy, and the cellular immunity indices were evaluated. In all patients, after a year of therapy corresponding to clinical guidelines, there was an improvement in quality of life indices, decreased rates of recurrent bacterial infections. At the same time, 40% of them continued to suffer, on average, 5.4 ± 1.1 times a year and required long-term courses of antibiotic therapy. Evaluation of immune status did not reveal statistically significant differences in IgG plasma saturation between the groups of patients with different treatment efficiency: 8.7 (8-9) g/l and 9.1 (8.5-10.5) g/l, at $p = 0.5$. The differences related to immune cell factors in cases of smaller effect of IVIG therapy are manifested in higher relative numbers of T effectors containing lytic Granzyme B granules and CD14⁺CD284⁺ monocytes, accompanied by lower spontaneous active oxygen forms produced by neutrophils, lesser contents of CD16⁺ natural killers in peripheral blood.

The obtained data illustrate the value of monitoring, not only serum IgG level, but also the parameters of the cellular immune response. Such analysis may be essential as a prognostic criterion for efficacy of IVIG therapy. Reduced levels of some parameters of innate immunity cells serves a basis to formulate the concept of combined treatment and usage of tools that alter functions of immunocompetent cells.

Keywords: CVID, IVIG replacement therapy, cellular immunity

Исследование проведено в рамках государственного задания на выполнение прикладных научных исследований, № госрегистрации: АААА-А18-118013090213-5.

Введение

Общевариабельная иммунная недостаточность (ОВИН) является наиболее частым пер-

вичным иммунодефицитом (ПИД) у взрослых с распространенностью 1:25 000 [5, 6]. Уже само определение этого варианта ПИД отражает его отличительную характеристику: разнообразие клинических фенотипов и гетерогенная группа генетических поломок. Вне зависимости от природы первичного дефекта, кульминацией ОВИН является недостаточность антител и поздняя кли-

ническая манифестация [8]. В связи с тем, что основным проявлением генетических ошибок иммунитета в данном случае является угнетение антителопродукции, логичным представляется факт применения иммуноглобулинотерапии для замещения недостающего эффекторного механизма адаптивной защиты. В силу данного факта в настоящее время стандартом лечения ОВИН является регулярное пожизненное использование внутривенных (ВВИГ) или подкожных иммуноглобулинов класса G. В отношении пациентов с инфекционным фенотипом ОВИН накопленный опыт демонстрирует эффективность такого лечения с позиции как субъективного улучшения качества жизни, так и объективного снижения частоты и тяжести инфекций [2, 7]. Однако далеко не во всех случаях улучшение клинической симптоматики существенно, при этом нет общепризнанных прогностических критериев эффективности заместительной терапии [3, 4, 10]. Тот факт, что в реализацию противоинфекционной защиты вовлечен не только гуморальный иммунитет, привлекает внимание к изучению особенностей клеточных факторов иммуногенеза в условиях проведения заместительной терапии.

Цель настоящего исследования — выявить изменения в клеточном компоненте адаптивного и врожденного иммунного ответа в зависимости от эффективности заместительной терапии пациентов с инфекционным фенотипом ОВИН.

Материалы и методы

Группу наблюдения составили 15 пациентов, 11 женщин и 4 мужчины. Средний возраст $39,7 \pm 11,7$ лет, возраст возникновения первых клинических проявлений 25 ± 10 лет, возраст выявления ОВИН $32,6 \pm 12,4$ лет. Диагноз верифицирован в соответствии с критериями International Union of Immunological Societies (IUIS) и Федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению пациентов с первичными иммунодефицитами гуморального звена. После выявления ОВИН пациенты получили курс терапии ВВИГ в режиме насыщения (0,8 г/кг массы тела), по стабилизации уровня IgG не менее 7,5–8,0 г/л дальнейшая заместительная терапия проводилась в поддерживающей дозе 0,4 г/кг массы тела, ежемесячно. В настоящей работе представлены данные ретроспективной оценки клинической манифестации заболевания в течение полного года регулярной заместительной терапии. За этот период проведен подсчет частоты ОРВИ с развитием осложнений либо без них, количества эпизодов обострений в очагах хронических инфекций, контроль уровня IgG перед каждой оче-

редней инфузией. Кроме того, каждые три месяца осуществлялась оценка параметров иммунного статуса в соответствии с методологией, направленной на комплексный анализ количественных и функциональных параметров клеточных и гуморальных компонентов адаптивного и врожденного иммунного ответа [1]. Использовали проточную цитофлюориметрию с соответствующим целям исследования набором моноклональных антител (производства Beckman Coulter, США), НСТ-тест со спектрофотометрическим учетом результатов, реакцию радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини. Статистическая обработка данных иммунологического анализа проведена с использованием программ Statistica 10 (StatSoft Inc., США) и R (версия 3.2, R Foundation for Statistical Computing, Австрия). Описательную статистику количественных признаков представляли в виде центральной тенденции медианы и межквартильного размаха (25 и 75 процентиля), представлено в тексте как Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Сравнение медиан в группах осуществляли с помощью теста Манна–Уитни. Сравнение средних уровней в группах проводилось с использованием критерия Вилкоксона для связанных выборок. Различия признавались статистически значимыми на уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты анализа анамнестических данных пациентов, составивших группу наблюдения, показали, что в 100% случаев с раннего детства отмечались ОРВИ затяжного характера с последующим развитием осложнений и необходимостью продолжительного применения антибиотиков. У всех пациентов в анамнезе регистрировались ежегодные бронхиты при вариабельной частоте рецидивов в течение года. У 5 человек (33%) острый бронхит приводил к осложнениям в виде повторных эпизодов пневмоний, у одного развился адгезивный плеврит. У 5 человек (33%) диагностировали синуситы с потребностью в проведении пункций и применением антибиотиков с продолжительностью курсов выше стандартных схем. У троих пациентов (20%) проводилось лечение гнойного отита, в ряде случаев диагностировано снижение слуха. Помимо рецидивов бактериальных инфекций, у трех человек (20%) отмечались частые (до 5–7 эпизодов в год) рецидивы герпетических высыпаний. В среднем в возрасте после 15 лет интенсивность инфекционной манифестации недостаточности антителопродукции возросла и в среднем в группе составила 6–8 раз в течение года. У троих человек (20%) развилась бронхоэктатическая болезнь на

фоне ежегодных эпизодов пневмонии в течение нескольких лет. В возрастном промежутке от 20 до 30 лет этим больным было проведено хирургическое лечение (билобэктомия и пульмонэктомия). У одного пациента (6,6%) диагностирован адгезивный плеврит на фоне двух рецидивов пневмоний в течение года. У двух пациенток (13%) зарегистрированы частые рецидивы бактериальных инфекций придаточных пазух носа, приведшие к развитию менингита. У двух других больных диагностированы ежегодные синуситы с потребностью в проведении пункций 1-2 раза в год, гнойные отиты.

После верификации диагноза и насыщения IgG на уровне 7-8 г/л пациенты получали ежемесячную терапию ВВИГ в поддерживающей дозе. Длительный клинико-иммунологический мониторинг пациентов с ОВИН позволил провести ретроспективную оценку эффективности заместительной терапии в условиях ее регулярного проведения в течение года.

У всех пациентов через год патогенетической терапии, соответствующей клиническими рекомендациями, отмечено улучшение показателей качества жизни, значительное уменьшение случаев рецидивов бактериальных инфекций, сокращение частоты и длительности приема антибиотиков. Так, если до начала заместительной терапии средняя частота обострений очагов хронических инфекций в наблюдаемой группе была в пределах $6,9 \pm 1,0$, то уже через год составила $3,1 \pm 1,8$. Угрожающих жизни состояний, таких как сепсис, менингит, пневмония, не регистрировалось. Между тем, несмотря на то, что условия заместительной терапии были соблюдены у всех (значения претрансфузионного уровня сывороточных иммуноглобулинов не снижались менее 7 г/л), имелись различия в степени выраженности клинических проявлений в группе в целом. Так, если у 9 человек (в 60% случаев) частота эпизодов инфекций за год в среднем составила $1,3 \pm 1$ при длительности приема антибиотиков не более 7 дней, то 6 человек (40 %) продолжали болеть в среднем $5,4 \pm 1,1$ раз в год и имели потребность в продолжительных курсах антибиотикотерапии (10-14 дней). Соответственно, для решения поставленных нами задач и выявления возможных отличий в показателях иммунного реагирования, все пациенты была разделена на 2 группы в зависимости от степени выраженности клинической манифестации ОВИН в условиях регулярного применения ВВИГ. При сопоставлении данных о насыщении плазмы IgG статистически значимых различий между группами не выявлено: 8,7 (8-9) г/л и 9,1 (8,5-10,5) г/л, $p = 0,5$. Не отлича-

лись группы и по числу В-лимфоцитов периферической крови $CD20^+$ ($\times 10^9/л$) 0,15 (0,12-0,21) и 0,13 (0,05-0,18), $p = 0,6$. Сопоставление параметров, отражающих Т-систему адаптивного иммунитета, не показало статистически достоверной разницы в количестве Т-клеток $CD3^+$ ($\times 10^9/л$) 1,4 (1,1-1,6) и 1,5 (1,2-1,5), $p = 0,66$. Не отличались группы между собой и по распределению субпопуляций Т-лимфоцитов: $CD3^+CD4^+$ ($\times 10^9/л$) 0,59 (0,37-0,81) и 0,55 (0,46-0,72), $p = 0,8$; $CD3^+CD8^+$ ($\times 10^9/л$) 0,46 (0,42-0,51) и 0,49 (0,43-0,52), $p = 0,6$. Следует отметить тенденцию к увеличению относительного числа Т-регуляторных клеток при меньшей эффективности ВВИГ: $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (%) 1,8 (1,1-2,5) и 1,3 (1-2,2), $p = 0,08$. Единственным показателем, имеющим достоверный критерий отличия $p = 0,0001$, является относительное содержание функционально активных Т-эффекторов. При менее выраженном эффекте заместительной терапии число Т-клеток, содержащих литические гранулы гранулы В, больше, чем при лучшей эффективности: $CD8^+Gr^+$ (%) 26 (21-30) и 40 (33-42), $p = 0,0001$.

В параметрах, отражающих механизмы реализации врожденных иммунных реакций, различия между группами сравнения затрагивают все обследованные нами виды клеточных элементов. Так, у пациентов с меньшей эффективностью ВВИГ-терапии моноциты обладают готовностью к распознаванию большего числа паттернов через TLR4. Этот факт документирует количество $CD14^+CD284^+$ клеток, (%): 21 (16,5-31,5) в условиях большего эффекта и 41 (36-48) при менее выраженной эффективности, $p = 0,003$. Различия в показателях нейтрофильного фагоцитоза также иллюстрируют статистически подтвержденную разницу в значениях метаболической активности этих клеток. При меньшей эффективности заместительной терапии способность к спонтанной продукции активных форм кислорода ниже, нежели при менее значимом эффекте: НСТсп (у. е.) 93 (92-94) и 102 (95-104) соответственно, при $p = 0,002$. Статистически достоверные отличия нашли отражения и в показателях системы натуральных киллеров. Так, у пациентов с менее выраженным эффектом лечения посредством замещения иммуноглобулинов, меньшее относительное число NK по отношению к пациентам из группы сравнения: $CD16^+$ (%) 6 (4-10) и 9 (6-12), $p = 0,04$.

Таким образом, полученные нами результаты отчетливо демонстрируют, что ВВИГ-терапия ОВИН, приводя к насыщению иммуноглобулинами класса G до уровня практически здоровых, не у всех пациентов обеспечивает полную ста-

близацию инфекционной симптоматики. Не умаляя безусловной значимости заместительной терапии при ПИД гуморального звена, следует отметить, что ее применение не всегда имеет достаточный эффект в контроле клинической манифестации. Представленные данные согласуются с публикациями других исследователей, в которых показано сохранение выраженной инфекционной симптоматики нарушения антителообразования при нормальных значениях IgG и, наоборот, ее отсутствие при уровнях IgG менее 7 г/л (4-9). Объяснение недостаточной эффективности ВВИГ-терапии находят в невозможности только за счет IgG обеспечить полноценность мукозальной иммунной защиты. Отсутствие либо значительное угнетение IgA и IgM у пациентов с ОВИН даже в условиях регулярной ВВИГ-терапии нарушает мукоцилиарный клиренс, приводит к активации бактериальной адгезии, что, в свою очередь требует высоких эффекторных потенциалов клеточных компонентов местного иммунитета [3]. Полученные нами результаты анализа показателей системного иммунитета убедительно демонстрируют роль клеточных факторов в клинической манифестации неполноценности гуморального звена. Так, на фоне регулярной заместительной терапии в группе пациентов, подверженных в большей степени острым респираторным инфекциям и развитию осложнений, снижены функциональные характеристики фагоцитарного звена, угнетены

процессы созревания полноценно реагирующих натуральных киллеров. С другой стороны, усиление экспрессии моноцитами TLR4 и повышение доли цитолитически активных Т-эффекторов в условиях неполного эффекта заместительной терапии служит иллюстрацией дальнейшего вовлечения компенсаторных ресурсов врожденной и адаптивной иммунной защиты.

Заключение

У пациентов при неполной компенсации клинической картины ОВИН на фоне ВВИГ, в сравнении с благоприятным вариантом ее течения, выявлена редукция количественных параметров лимфоцитов врожденного иммунитета, кислородпродуцирующей активности нейтрофилов, повышение экспрессии TLR4 и цитолитической активности Т-клеток. Динамическое наблюдение за пациентами с ОВИН, получающими ВВИГ-терапию, диктует необходимость мониторингования параметров клеточного звена иммунного ответа в качестве прогностического критерия эффективности лечения. Полученные данные о снижении функциональных параметров клеток врожденного иммунитета на фоне заместительной терапии служат основанием для формулирования концепции комбинированной терапии, где регулярное введение ВВИГ можно сочетать с применением иммуностропных препаратов, воздействующих на функциональные свойства клеток иммунной системы.

Список литературы / References

1. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 352 с. [Khaitov R.M., Pinigin B.V., Yarilin A.A. Guidelines for clinical immunology. Diagnosis of diseases of the immune system: a guide for doctors]. Moscow: GEOTAR-Media, 2009. 352 p.
2. Ameratunga R., Woon S.T., Gillis D., Koopmans W., Steele R. New diagnostic criteria for common variable immune deficiency (CVID), which may assist with decisions to treat with intravenous or subcutaneous immunoglobulin. *Clin. Exp. Immunol.*, 2013, Vol. 174, no. 2, pp. 203-211.
3. Baumann U., Miescher S., Vonarburg C. Immunoglobulin replacement therapy in antibody deficiency syndromes: are we really doing enough? *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, no. 178, pp. 83-85.
4. Edwards E.S.J., Bosco J.J., Aui P.M., Stirling R.G., Cameron P.U., Chatelier J., Hore-Lacy F., O'Hehir R.E., van Zelm M.C. Predominantly antibody-deficient patients with non-infectious complications have reduced naive B, Treg, Th17, and Tfh17 cells. *Front. Immunol.*, 2019, no. 10, 2593. doi: 10.3389/fimmu.2019.02593.
5. Gathmann B., Binder N., Ehl S., Kindle G. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies. ESID Registry Working Party. *Clin. Exp. Immunol.*, 2012, Vol. 167, no. 3, pp. 479-491.
6. Li R., Zheng Y. Common variable immunodeficiency with genetic defects identified by whole exome sequencing. *BioMed Res. Int.*, 2018, 3724630. doi: 10.1155/2018/3724630.
7. Quinti I., Soresina A., Guerra A., Rondelli R., Spadaro G., Agostini C., Milito C., Trombetta A.C., Visentini M., Martini H., Plebani A., Fiorilli M. Effectiveness of immunoglobulin replacement therapy on clinical

outcome in patients with primary antibody deficiencies: results from a multicenter prospective cohort study. *J. Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 31, no. 3, pp. 315-322.

8. Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfiha A., Chatila T., Cunningham-Rundles C., Etzioni A., Franco J.L., Holland S.M., Klein C., Morio T., Ochs H.D., Oksenhendler E., Picard C., Puck J., Torgerson T.R., Casanova J.L., Sullivan K.E. Human inborn errors of immunity: 2019 update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J. Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 40, pp. 24-64.

9. Shillito B., Gennery A. X-Linked agammaglobulinaemia: outcomes in the modern era. *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 183, pp. 54-62.

10. Sizyakina L., Andreeva I., Antonova E., Kharitonova M. Effect of replacement therapy on the T-cell function in patients with primary agammaglobulinemia. *J. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 34, pp. 696-747.

Авторы:

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

Андреева И.И. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Данилова Д.И. — аспирант кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

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

Andreeva I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Danilova D.I., Graduate Student, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 20.03.2020

Отправлена на доработку 20.04.2020

Принята к печати 23.04.2020

Received 20.03.2020

Revision received 20.04.2020

Accepted 23.04.2020

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ГИБРИДНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Солдатенкова А.В., Кудряшова А.М., Гаврилова Н.Ф.,
Яковлева И.В., Борисова О.В., Свиридов В.В., Михайлова Н.А.

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

Резюме. Гибридный рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI, содержащий в своем составе аминокислотные последовательности трех наиболее значимых антигенов *P. aeruginosa* (мембранных белков OprF, OprI и анатоксина aTox), был включен в состав вакцины против синегнойной инфекции. Контроль качества гибридного рекомбинантного белка и вакцины на его основе предполагает определение его подлинности и полноты сорбции препарата на гидроксиде алюминия.

Цель исследования – разработка иммуноферментного метода контроля качества вакцинного препарата на основе гибридного рекомбинантного белка *P. aeruginosa*.

Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, специфичные к слитому рекомбинантному белку, были получены путем слияния злокачественной линии миеломы мыши и иммунных спленоцитов мышей, вакцинированных отдельными рекомбинантными белками синегнойной палочки. Для наработки антител в препаративных количествах гибридные клетки культивировали *in vivo* в мышцах линии BALB/c. Супернатанты клеточных культур и асцитные жидкости хроматографически очищали на иммунном сорбенте. Конъюгирование антител с пероксидазой хрена проводили согласно методу Nakane P.K. Гибридный рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI выявляли в твердофазном иммуноферментном анализе с использованием полученной панели моноклональных антител и конъюгатов моноклональных антител с пероксидазой корня хрена, специфичных к различным эпитопам белка. В качестве калибровочных стандартов для построения калибровочного графика использовали разведения, содержащие от 78 нг/мл до 5000 нг/мл рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI.

Для детекции OprF-aTox-OprI апробированы 55 вариантов пар моноклональных антител, в 11 случаях показана способность выявлять рекомбинантный белок. Критерием отбора наиболее чувствительных и специфичных вариантов ИФА служил предел количественного обнаружения. Для всех 11 вариантов теста посчитан предел количественного обнаружения. В результате проведенных исследований были выбраны два варианта иммуноферментного анализа для контроля качества гибридного рекомбинантного белка, обладающие наибольшей чувствительностью. Первый вариант включал в себя пару моноклональных антител, специфичных к эпитопам OprF и OprI, второй вариант – к эпитопам aTox и OprI. Пределы количественного обнаружения составили 2,9 и 13,6 нг/мл (0,0058 и 0,027% от предполагаемого содержания антигена в вакцине) для первого и второго вариантов ИФА.

Отработаны два варианта ИФА для выявления гибридного рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI. Первый вариант позволяет определить количество белка и оценить полноту его сорбции на геле гидроокиси алюминия. Для подтверждения подлинности белка целесообразно применять оба метода, поскольку они позволяют доказать наличие всех трех антигенов (OprF, aTox и OprI), присутствующих в слитом белке.

Ключевые слова: вакцина, *Pseudomonas aeruginosa*, гибридный рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI, иммуноферментный анализ

Адрес для переписки:

Солдатенкова Алена Владимировна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (495) 916-25-87.
E-mail: Sol.alena.v@yandex.ru

Address for correspondence:

Soldatenkova Alena V.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow,
Malyy Kazenny lane, 5a.
Phone: 7 (495) 916-25-87.
E-mail: Sol.alena.v@yandex.ru

Образец цитирования:

А.В. Солдатенкова, А.М. Кудряшова, Н.Ф. Гаврилова,
И.В. Яковлева, О.В. Борисова, В.В. Свиридов,
Н.А. Михайлова «Разработка иммуноферментного
метода контроля качества вакцины на основе
гибридного рекомбинантного белка *Pseudomonas
aeruginosa*» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22,
№ 4. С. 805-810. doi: 10.15789/1563-0625-DOE-1906
© Солдатенкова А.В. и соавт., 2020

For citation:

A.V. Soldatenkova, A.M. Kudryashova, N.F. Gavrilova,
I.V. Yakovleva, O.V. Borisova, V.V. Sviridov, N.A. Mikhailova
“Development of ELISA test for the quality control of
Pseudomonas aeruginosa recombinant vaccine based on
the hybrid recombinant protein”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 4,
pp. 805-810. doi: 10.15789/1563-0625-DOE-1906
DOI: 10.15789/1563-0625-DOE-1906

DEVELOPMENT OF ELISA TEST FOR THE QUALITY CONTROL OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* RECOMBINANT VACCINE BASED ON THE HYBRID RECOMBINANT PROTEIN

Soldatenkova A.V., Kudryashova A.M., Gavrilova N.F., Yakovleva I.V., Borisova O.V., Sviridov V.V., Mikhailova N.A.

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

Abstract. A hybrid recombinant protein containing the amino acid sequences of the three most significant *Pseudomonas aeruginosa* antigens (membrane proteins OprF, OprI and toxoid aTox) was incorporated into a vaccine against *Pseudomonas* infection. Quality control of a hybrid recombinant protein and appropriate vaccine includes determination of authenticity and completeness of adsorption upon aluminum hydroxide adjuvant. The aim of our study was to develop techniques of quality control for a vaccine based on the hybrid OprF-aTox-OprI recombinant protein specific to *P. aeruginosa*. Hybridomas secreting specific monoclonal antibodies for OprF-aTox-OprI were derived from the fusion of myeloma cells and murine spleen cells immunized with recombinant proteins *P. aeruginosa*. To produce sufficient quantities of antibodies, the hybrid cells were *in vivo* cultured in BALB/c mice. Supernates and ascite liquids were chromatographically purified with immune sorbent. Conjugation of antibodies with horseradish peroxidase was carried out according to P.K.Nakane. The hybrid OprF-aTox-OprI recombinant protein was detected by the solid-phase ELISA, using a panel of monoclonal antibodies and conjugates of monoclonal antibodies with horseradish peroxidase. Monoclonal antibodies were specific for different OprF-aTox-OprI epitopes. Titration assays containing OprF-aTox-OprI protein at 78 ng/ml to 5000 ng/ml were used as quantitative standards for calibration curves.

To identify the recombinant protein OprF-aTox-OprI, 55 variants of of MAbs pairs were tested. Limits of quantitative detection served for selection of most sensitive and specific ELISA variants. The quantitative detection limit was calculated for all 11 ELISA variants. Two ELISA variants with the highest sensitivity were selected for quality control of the hybrid recombinant protein. The limits of quantitative detection were, respectively, 2.9 and 13.6 ng/ml (0.0058 and 0.027% of the estimated antigen content in the vaccine) for the first and second ELISA variants. The first variant included a pair of monoclonal antibodies specific for the OprF and OprI epitopes, the second variant represented aTox and OprI epitopes. Two variants of ELISA were developed to detect the hybrid recombinant OprF-aTox-OprI protein. The first variant allows to determine the protein amount and to evaluate completeness of its adsorption on aluminum hydroxide. To confirm authenticity of the protein, both methods must be used, since they can detect all three antigens (OprF, aTox and OprI) which are present in the fusion protein.

Keywords: vaccine, *P. aeruginosa*, hybrid recombinant protein, OprF-aTox-OprI, enzyme-linked immunoassay

Введение

Устойчивость *P. aeruginosa* к лекарственным препаратам снижает эффективность профилактики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, вызываемых синегнойной палочкой, а также приводит к увеличению их тяжести и длительности течения [3]. Поэтому по всему миру проводятся исследования по созданию вакцины на основе протективных антигенов *P. aeruginosa*, предназначенной для профилактики синегнойных инфекций [1, 7, 8, 9].

В ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова в течение ряда лет проводились исследования по разработке вакцины на основе рекомбинантных белков синегнойной палочки, обладающих протективной активностью: мембранных белков OprF и OprI, анатоксина с делецией 106 аминокислотных остатков С-концевого участка [2] и слитого рекомбинантного варианта на основе аминокислотных последовательностей вышеуказанных белков.

Рекомбинантные белки *P. aeruginosa* вошли в состав вакцины в виде комплекса OprF и анатоксина [4], сорбированных на гидроокиси алюминия. Для оценки качества такого варианта препарата получена панель моноклональных антител, которые использованы для создания методов его контроля в ИФА [6].

Вторым направлением работы являлось создание вакцины на основе гибридного рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI, включающего аминокислотные последовательности анатоксина и двух мембранных белков (OprF и OprI) *P. aeruginosa* [5].

Цель настоящего исследования — разработка иммуноферментного метода контроля качества вакцинного препарата на основе слитого рекомбинантного белка.

Материалы и методы

В работе использованы: рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI; МкАт, специфичные к отдельным рекомбинантным белкам: OprF (№ 1, 5,

6, 7, 8), анатоксину (№ 28) и OprI (№ 1, 2) в качестве иммобилизованных; конъюгаты МкАт с пероксидазой хрена, специфичные к OprF (КГ № 1, 5, 6, 7, 8), анатоксину (КГ № 21, 19), OprI (КГ № 1, 2) в качестве детектирующих антител.

Реактивы: 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, компоненты буферных растворов (Sigma, Fluka, Helicon). Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Milli-Q System, Millipore, США). Для проведения ИФА использовали 96-луночные планшеты (Corning, США, кат. № 2593).

Оборудование: планшетный спектрофотометр Bio-Rad Model 680 (Bio-Rad, Германия); термостатируемый шейкер-встряхиватель ELM1 SkyLine (ELMI, Латвия); вошер Bio-Rad PW 40 (Bio-Rad, Германия); весы OHAUS Discovery (OHAUS, США); pH-метр Mettler Toledo MP 220 (Sigma-Aldrich, США).

Для получения гибридом мышей линии BALB/c иммунизировали соответствующими рекомбинантными белками. Слияние иммунных спленоцитов и злокачественной линии миеломы мыши P3-X63-Ag8.653 проводили в соответствии с общепринятым протоколом при помощи ПЭГ 1450 (Sigma). Продуцирующие антитела гибридомы отбирали на основании результатов иммуноферментного анализа. Клонирование проводили методом предельных разведений в ранние сроки. Все гибридные культуры-продуценты антител криоконсервировали в жидком азоте.

Для наработки антител в препаративных количествах гибридные клетки культивировали *in vivo* в мышцах линии BALB/c. Предварительно, за 10-14 дней до прививки гибридом, животным внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл пристана (Sigma). Инокулировали клетки в дозе $3-5 \times 10^6$ на животное.

Супернатанты клеточных культур и асцитные жидкости хроматографически очищали на иммунном сорбенте. Конъюгирование антител с пероксидазой хрена проводили согласно методу Nakane P.K.

Для приготовления иммуносорбента в 96-луночные планшеты вносили по 100 мкл моноклональных антител к анатоксину, OprF или OprI в концентрации 10 мкг/мл в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2 и выдерживали в течение 19-22 ч при температуре 5 ± 3 °С. После инкубации планшеты промывали один раз деионизированной водой, далее на 1 час при комнатной температуре вносили блокирующий раствор, представляющий собой 0,02 М фосфатный буферный раствор pH 7,2, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Tween 20. После удаления блокирующего раствора планшеты высушивали в ламинарном потоке в течение 2 часов, запаивали в полиэтиленовые пакеты и хранили при температуре 5 ± 3 °С до использования.

Для проведения анализа в планшет с иммобилизованными моноклональными антителами вносили по 100 мкл калибраторов, содержащих рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI (5000, 2500, 1250, 625, 312, 156, 78, 0 нг/мл) и выдерживали при температуре 37 ± 2 °С и постоянном встряхивании со скоростью вращения 500 об/мин в течение 45 ± 2 мин. Затем планшеты отмывали пятикратно и в лунки вносили по 100 мкл конъюгата МкАт с пероксидазой моноклональных антител к анатоксину, OprF или OprI и выдерживали 30 ± 2 мин в тех же условиях и осуществляли промывку планшетов.

Затем в лунки 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 2 N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Строили калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI.

В каждом случае проводили подбор параметров ИФА с целью достижения максимальной чувствительности. Чувствительность оценивали путем определения предела обнаружения (ПО) и предела количественного обнаружения (ПКО).

Статистическая обработка результатов

Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2013.

Результаты и обсуждение

Для количественного определения рекомбинантного слитого белка OprF-aTox-OprI исследовано 55 комбинаций антител для захвата и детекции, специфичных к эпитопам, находящимся на разных участках слитого белка.

Критерием отбора наиболее чувствительных и специфичных вариантов служил предел количественного обнаружения (ПКО), который определяли по калибровочному графику зависимости оптической плотности от концентрации рекомбинантного слитого белка OprF-aTox-OprI. ПКО представлял собой концентрацию препарата, соответствующую пороговому значению оптической плотности, определяемому по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{порог}} = \text{ОП}_{\text{ср.К}} + 10\sigma,$$
где $\text{ОП}_{\text{ср.К}}$ – среднее арифметическое значение ОП нулевой пробы, σ – среднее квадратическое отклонение ОП нулевой пробы (8 повторов).

Рабочие разведения концентраций антител для иммобилизации в лунках планшета и конъюгатов антител с пероксидазой устанавливали в предварительных экспериментах. Результаты определения ПКО для вариантов сэндвич-ме-

тогда со значениями ПКО, не превышающими 100 нг/мл, представлены в таблице 1.

Для дальнейшей работы были выбраны два варианта ИФА, обладающие достаточной чувствительностью и включающие антитела, специфичные ко всем трем участкам слитого белка:

МкАт № 5 к OprF – МкАт № 2 к OprI, конъюгированные с пероксидазой;

МкАт № 28 к анатоксину – МкАт № 2 к OprI, конъюгированные с пероксидазой.

На рисунках 1 и 2 представлены калибровочные графики зависимости оптической плотности от концентрации белка OprF-aTox-OprI при использовании вышеперечисленных пар МкАт. Для обоих вариантов установлены диапазоны концентраций калибровочных образцов, проведена оценка приемлемости аппроксимации и воспроизводимости.

Построенные графики определяют диапазон концентраций калибровочных образцов, которые могут использоваться для количественного определения рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI. Минимальный калибратор должен содержать искомый белок в концентрации не ниже предела количественного обнаружения (ПКО). Концентрация максимального калибратора определяется техническими характеристиками прибора; обычно оптическая плотность, регистрируемая для максимального калибратора, не должна превышать 2,0 о.е. Этим условиям соответствовали диапазоны концентраций 2,9-2500 нг/мл и 13,6-5000 нг/мл для 1-го и 2-го варианта соответственно.

Приемлемость аппроксимации проверяли обратным пересчетом концентраций калибровочных образцов с применением выбранной функции, с учетом требований, что не менее 75% рассчитанных значений концентраций калибровочных образцов может отклоняться от номинальных значений не более чем на 20%, а концентрация калибратора, соответствующего пределу количественного обнаружения, – не более чем на 25%. Полиномиальная аппроксимация удовлетворяла перечисленным условиям, и результаты ОП в выбранном диапазоне концентраций анти-

гена подлежали количественной интерпретации. Коэффициент вариации, рассчитанный по ОП в четырех повторах для каждой концентрации антигена, не превышал 8%.

Контроль качества гибридного рекомбинантного белка и вакцины на его основе предполагает определение подлинности и полноты сорбции препарата.

Разрабатываемый метод количественного определения рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI базируется на методе твердофазного ИФА в сэндвич-варианте, при котором на внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы моноклональные антитела к анатоксину, OprF или OprI. На первой стадии анализа в лунках с иммуносорбентом происходит образование иммунных комплексов «антитело/антиген». На второй стадии анализа, после отмывки, образовавшиеся иммунные комплексы взаимодействуют с моноклональными антителами мыши к анатоксину, OprF или OprI, конъюгированными с пероксидазой хрена.

При конструировании сэндвич-метода для выявления слитого рекомбинантного антигена использованы антитела к разным эпитопам. В настоящем исследовании апробированы 55 вариантов пар антител. Поскольку рекомбинантный слитый белок представляет собой аминокислотную последовательность трех разных антигенов *P. aeruginosa*, исследовали пары антител, специфичные к эпитопам, находящимся на разных участках слитого белка. Для количественного определения рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI были выбраны два варианта ИФА, обладающие наибольшей чувствительностью и включающие антитела, специфичные ко всем трем участкам слитого белка: анатоксину, OprF и OprI.

Поскольку в процессе синтеза не исключена деградация полипептидной цепи, наиболее перспективными вариантами выявления полноразмерного белка можно считать тесты, в которых в качестве пары используются моноклональные антитела к эпитопам, находящимся на N- и C-концах полипептидной цепи, а именно специ-

ТАБЛИЦА 1. ПРЕДЕЛЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ТЕСТОВ

TABLE 1. QUANTIFICATION LIMITS FOR VARIOUS ELISAs

МкАт на подложке Absorbad Mab	КГ Conjugated Mab							
	№ 1-ПХ OprI, нг/мл No. 1-HRP OprI, ng/ml	№ 2-ПХ OprI, нг/мл No. 2-HRP OprI, ng/ml	№ 1-ПХ OprF, нг/мл No. 1-HRP OprF, ng/ml	№ 5-ПХ OprF, нг/мл No. 5-HRP OprF, ng/ml	№ 6-ПХ OprF, нг/мл No. 6-HRP OprF, ng/ml	№ 7-ПХ OprF, нг/мл No. 7-HRP OprF, ng/ml	№ 8-ПХ OprF, нг/мл No. 8-HRP OprF, ng/ml	
№ 5 OprF	3,7	2,9	–	–	–	–	–	
№ 7 OprF	74,9	16,3	–	–	–	–	–	
№ 28 анатоксин No. 28 toxoid	33,7	13,6	19,9	88,8	78,7	17,6	74,2	

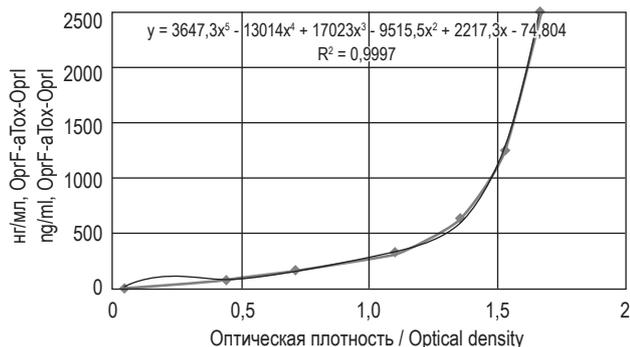


Рисунок 1. Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации OprF-aTox-OprI (нг/мл) с использованием пары МкАт № 5 к OprF – МкАт № 2 к OprI, конъюгированных с пероксидазой хрена

Figure 1. Standard curve of the dependence of optical density on the concentration of OprF-aTox-OprI (ng/ml). ELISA with using a pair of Mab No. 5 specific to OprF and Mab No. 2 specific to OprI conjugated to horseradish peroxidase

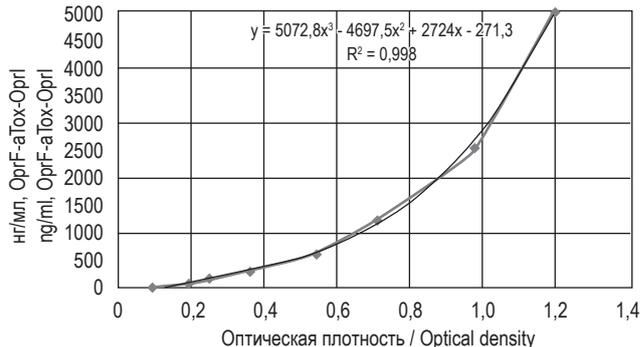


Рисунок 2. Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации OprF-aTox-OprI (нг/мл) в тесте с использованием пары МкАт № 28 к анатоксину – МкАт № 2 к OprI, конъюгированных с пероксидазой хрена

Figure 2. Standard curve of the dependence of optical density on the concentration of OprF-aTox-OprI (ng/ml). ELISA with using a pair of Mab No. 28 specific to toxoid and Mab No. 2 specific to OprI conjugated to horseradish peroxidase

фичным к аминокислотным последовательностям белков OprF и OprI. Вариант теста с использованием в качестве иммобилизованных антител МкАт № 5, специфичных к OprF, и конъюгата МкАт № 2-ПХ, специфичного к OprI, удовлетворял требуемым условиям и обладал достаточной чувствительностью: ПКО составил 2,9 нг/мл (0,0058% от предполагаемого содержания антигена в вакцине).

Такой тест может быть использован для количественного определения рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI, а также оценки полноты сорбции вакцины на его основе.

С другой стороны, для контроля подлинности вакцинного препарата, состоящего из слитого рекомбинантного белка, требуется подтверждение наличия эпитопов всех трех антигенов, вхо-

дящих в его состав. С этой целью дополнительно отработан второй вариант теста с использованием МкАт № 28, специфичного к анатоксину, и конъюгата МкАт № 2-ПХ, специфичного к OprI (ПКО составил 13,6 нг/мл – 0,027% от предполагаемого содержания антигена в вакцине).

Таким образом, в результате проведенных исследований разработаны два метода ИФА для контроля качества рекомбинантного слитого белка OprF-aTox-OprI. Первый вариант позволяет определить количество белка и оценить полноту его сорбции на геле гидроокиси алюминия. Для подтверждения подлинности белка целесообразно применять оба метода, поскольку они позволяют доказать наличие всех трех антигенов, присутствующих в слитом белке.

Список литературы / References

1. Благовидов Д.А., Костинов М.П., Симонова О.И., Шмитко А.Д., Буркина Н.И., Шахназарян М.К. Переносимость вакцины против *P. aeruginosa* у детей с муковисцидозом и врожденными пороками развития легких // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2016. Т. 15, № 2 (87), С. 55-66. [Blagovidov D.A., Kostinov M.P., Simonova O.I., Shmitko A.D., Burkina N.I., Shahnazaryan M.K. The tolerability of the vaccine against *P. aeruginosa* in children with cystic fibrosis and congenital lung development. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2016, Vol. 15, no. 2 (87), pp. 55-66. (In Russ.)]
2. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств рекомбинантного комплекса белка F наружной мембраны и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* // Вестник Российской академии медицинских наук, 2016, Т. 71, № 1. С. 5-10. [Kaloshin A.A., Leonova E.I., Soldatenkova A.V. Assessment of protective properties of the recombinant complex of the outer membrane protein F and the toxoid of *Pseudomonas aeruginosa*. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2016, Vol. 71, no. 1, pp. 5-10. (In Russ.)]
3. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2015. Т. 17, № 3. С. 170-186. [Lazareva A.V., Tchebotar I.V., Kryzhanovskaya O.A., Tchebotar V.I., Mayanskiy N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 170-186. (In Russ.)]

4. Михайлова Н.А., Зими́на Е.М., Солдатенкова А.В., Калошин А.А. Разработка вакцины на основе рекомбинантных антигенов синегнойной палочки // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2019. № 1. С. 74-80. [Mikhailova N.A., Zimina E.M., Soldatenkova A.V., Kaloshin A.A. Development of the vaccine based on the recombinant antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 1, pp. 74-80. (In Russ.)]

5. Патент РФ № 2677790 С1, 2017.09.22. – Калошин А.А., Зими́на Е.М., Михайлова Н.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК pPA-OPRF-АТОХ-OPRI, кодирующая синтез гибридного рекомбинантного белка, включающего аминокислотные последовательности белков F и I наружной мембраны и атоксического варианта экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*, штамм *Escherichia coli* PA-OPRF-АТОХ-OPRI – продуцент гибридного рекомбинантного белка, и способ получения указанного белка. [RU patent No. 2677790 C1, 2017.09.22 – Kaloshin A.A., Zimina E.M., Mikhailova N.A. Recombinant plasmid DNA pPA-OPRF-ATOX-OPRI, encoding the synthesis of a hybrid recombinant protein, including the amino acid sequences of the outer membrane F and I proteins and the atoxic variant of exotoxin A *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* strain PA-OPRF-ATOX-OPRI – producer recombinant protein recombinant and method for producing said protein].

6. Солдатенкова А.В., Зими́на Е.М., Кудряшова А.М., Гаврилова Н.Ф., Яковлева И.В., Борисова О.В., Свиридов В.В., Михайлова Н.А. Разработка иммуноферментных методов оценки контроля качества рекомбинантной вакцины синегнойной // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2019. № 1. С. 95-100. [Soldatenkova A.V., Zimina E.M., Kudryashova A.M., Gavrilova N.F., Yakovleva I.V., O.V. Borisova, V.V. Sviridov, N.A. Mikhailova. Development of ELISAs for the quality control of a recombinant pseudomonas vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 1, pp. 95-100. (In Russ.)]

7. Doring G., Meisner C., Stern M. A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, no. 26, pp. 11020-11025.

8. Farajnia S., Peerayeh S.N., Tanomand A., Majidi J., Goudarzi G., Naghili B., Rahbarnia L. Protective efficacy of recombinant exotoxin A – flagellin fusion protein against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Can. J. Microbiol.*, 2015, Vol. 61, no. 1, pp. 60-64.

9. Zuercher A.W., Imboden M.A., Jampen S., Bosse D., Ulrich M., Chtioui H., Lauterburg B.H., Lang A.B. Cellular immunity in healthy volunteers treated with an octavalent conjugate *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, Vol. 143, no. 1, pp. 132-138.

Авторы:

Солдатенкова А.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Кудряшова А.М. – научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Гаврилова Н.Ф. – к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Яковлева И.В. – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов 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

Свиридов В.В. – к.м.н., заведующий лабораторией клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», 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

Authors:

Soldatenkova A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Protective Antigens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Kudryashova A.M., Research Associate, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Gavrilova N.F., PhD (Chemistry), Senior Research Associate, Laboratory of Cell Hybrids, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Yakovleva I.V., PhD (Biology), Leading Senior Research Associate, Laboratory of Cell Hybrids, 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

Sviridov V.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Cell Hybrids, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 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

Поступила 03.12.2019

Отправлена на доработку 29.01.2020

Принята к печати 11.03.2020

Received 03.12.2019

Revision received 29.01.2020

Accepted 11.03.2020

КОМБИНАЦИИ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Беляева С.В., Сташкевич Д.С., Бурмистрова А.Л.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. Туберкулез – широко распространенное инфекционное заболевание, вызываемое *M. tuberculosis*, которое является одной из основных причин смертности в мире. Согласно многочисленным литературным данным, это генетически детерминированное заболевание, и полиморфизм генов является механизмом, который приводит к прогрессированию от инфицирования к клинической манифестации. Восприимчивость к инфекции коррелирует с различными генами в нескольких локусах, и каждый отдельный ген играет определенную уникальную роль. Известно, что анализ отдельных полиморфных вариантов генов не дает достаточно полного представления о механизмах формирования предрасположенности к мультифакторным патологиям, таким как туберкулез, так как в основе их развития лежат сложные межгенные и ген-средовые взаимодействия, которые необходимо учитывать при прогнозировании риска развития активных форм заболевания и его тяжести. Концепция функционирования цитокинов в качестве биомаркеров туберкулеза предполагает, что их продукция и взаимодействия играют важную роль в иммунопатогенезе заболевания, так как они формируют цитокиновую цепь с уникальными функциями, где удаление любого звена цепи приводит к разрыву всего механизма формирования иммуновоспалительного процесса. IL-6 вместе с TNF α и IL-1 β инициируют ранние провоспалительные реакции при туберкулезе, стимулируя местную и системную воспалительную реакцию с участием всех известных механизмов провоспалительного действия с дальнейшим переходом к активации приобретенного иммунитета. Ранее нами был проведен комплекс исследований по оценке ассоциации аллелей и генотипов генов данных цитокинов с предрасположенностью/устойчивостью к туберкулезу легких у русских Челябинской области, в ходе которого установлены особенности распределения аллелей и генотипов генов IL-1 β , TNF α , IL-6 при туберкулезе легких и различных его формах. Были использованы следующие методы: выделение образцов ДНК из цельной крови, проведение генотипирования исследуемых полиморфизмов генов с помощью полимеразно-цепной реакции и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. В настоящем исследовании был проведен анализ межгенных взаимодействий генов провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF α , IL-6 с использованием метода сокращения многофакторной размерности у больных туберкулезом легких. Программа формирует оптимальные модели комбинаций исследуемых генов и их взаимодействий при туберкулезе. В результате исследования была установлена трехлокусная модель IL-6 (-174)*C – IL-1 β (+3953)*T – IL-1 β (+3953)*C, которая характеризовалась 100% воспроизводимостью и точностью предсказания 72%. Среди анализируемых полиморфизмов наибольшим предсказательным потенциалом обладал полиморфизм IL-6 (-174)*C – 15,27%.

Ключевые слова: межгенные взаимодействия, провоспалительные цитокины, генетический полиморфизм, туберкулез легких, метод сокращения многофакторной размерности

Адрес для переписки:

Сташкевич Дарья Сергеевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный
университет»
454021, Россия, г. Челябинск, ул. Молдавская, 25, кв. 15.
Тел.: 8 (351) 799-71-54.
E-mail: stashkevich_dary@mail.ru

Address for correspondence:

Stashkevich Daria S.
Chelyabinsk State University
454021, Russian Federation, Chelyabinsk,
Moldavskaya str., 25, apt 15.
Phone: 7 (351) 799-71-54.
E-mail: stashkevich_dary@mail.ru

Образец цитирования:

С.В. Беляева, Д.С. Сташкевич, А.Л. Бурмистрова
«Комбинации генов провоспалительных цитокинов
и их взаимодействия у больных туберкулезом русских
Челябинской области» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 4. С. 811-815.
doi: 10.15789/1563-0625-COP-2007
© Беляева С.В. и соавт., 2020

For citation:

S.V. Belyaeva, D.S. Stashkevich, A.L. Burmistrova
“Combinations of proinflammatory cytokine genes and their
interactions in Russian tuberculosis patients in the Chelyabinsk
Region”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 811-815.
doi: 10.15789/1563-0625-COP-2007
DOI: 10.15789/1563-0625-COP-2007

COMBINATIONS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES AND THEIR INTERACTIONS IN RUSSIAN TUBERCULOSIS PATIENTS IN THE CHELYABINSK REGION

Belyaeva S.V., Stashkevich D.S., Burmistrova A.L.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Tuberculosis is a widespread infectious disease caused by *M. tuberculosis*, which is one of the leading causes of death in the world. According to numerous literature data, this is a genetically determined disease, and genetical polymorphism is a mechanism that leads to progression from infection to clinical manifestation. Susceptibility to infection correlates with different genes at several loci, and each individual gene plays a unique role. It is known, that the analysis of individual polymorphic variants of genes does not provide a sufficiently complete picture of the mechanisms of formation of a predisposition to multifactorial pathologies, such as tuberculosis, since their development is based on complex intergenic and gene-environmental interactions, which must be taken into account when predicting the risk of developing active forms of the disease and its severity. The concept of the functioning of cytokines as biomarkers of tuberculosis suggests that their products and interactions play an important role in the immunopathogenesis of the disease, because they form a cytokine chain with unique functions, where the removal of any link in the chain disrupts the entire mechanism of the immuno-inflammatory process. IL-6, together with TNF α and IL-1 β , initiate early pro-inflammatory reactions in tuberculosis, stimulating local and systemic inflammatory reactions under participation of all common pro-inflammatory mechanisms with further transition to activation of acquired immunity. Earlier, we carried out a set of studies to evaluate the association of alleles and genotypes of these cytokine genes with a predisposition/resistance to pulmonary tuberculosis in Russians of the Chelyabinsk region. These studies have resulted into assessment of certain distribution patterns of IL-1 β , TNF α , IL-6 alleles and their genotypes in pulmonary tuberculosis and its various clinical forms. The following methods were used: isolation of DNA samples from whole blood, genotyping of the studied gene polymorphisms using PCR and RFLP techniques. In this study, we analyzed the intergenic interactions of the genes for the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF α , IL-6 using the method of reducing multifactor dimension in patients with pulmonary tuberculosis. The program designs optimal models of combinations for the studied genes and their interactions in tuberculosis patients. As a result of this study, a three-locus model IL-6 (-174)*C – IL-1 β (+3953)*T – IL-1 β (+3953)*C was established, which was characterized by 100% reproducibility and prediction accuracy of 72%. Among the analyzed polymorphisms, the IL-6 (-174)*C polymorphism possessed the highest predictive potential with 15.27%.

Keywords: intergenic interactions, pro-inflammatory cytokines, genetic polymorphism, pulmonary tuberculosis, multifactorial dimension, reduction

Введение

Туберкулез – одна из самых актуальных проблем мирового здравоохранения. Треть населения мира заражена *M. tuberculosis*, однако только у 10% инфицированных людей в течение жизни развивается активная форма [3], что свидетельствует о наличии естественной устойчивости. В настоящее время нет эффективных лекарств, вакцин и диагностических тестов на туберкулез, до сих пор не выявлены биомаркеры, которые могли бы эффективно использоваться при данной патологии. Поэтому существует острая необходимость поиска подходящего биомаркера или группы маркеров, которые помогут прогнозировать потенциальный риск развития заболевания, а также характер и тяжесть течения туберкулеза.

Недавно была предложена концепция функционирования цитокинов в качестве биомаркеров туберкулеза, так как считается, что их продукция и взаимодействия имеют важное значение для иммунопатогенеза заболевания [5, 8]. Согласно Симбирцеву А.С., одной из ключевых сторон нарушения механизма формирования нормальных иммунологических реакций при развитии иммунопатогенеза мультифакторных патологий является выпадение одного из звеньев цитокиновых цепей, что приводит к нарушению их функциональной целостности [4]. Известно, что ранние провоспалительные реакции при туберкулезе инициируются IL-6 вместе с TNF α и IL-1 β [8], которые приводят к активации приобретенного иммунитета [4]. IL-6, в отличие от

TNF α и IL-1 β , не так важен для антимикобактериальных эффекторных механизмов. В то же время данный цитокин имеет решающее значение для контроля роста микобактерий и для формирования устойчивости к туберкулезу после инфицирования [7, 10].

В предыдущих исследованиях мы изучали ассоциации аллелей и генотипов генов основных провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α , IL-6) с чувствительностью к туберкулезу легких у русских Челябинской области и установили особенности распределения аллелей и генотипов данных генов при заболевании и различных его формах [1, 2]. Важно отметить, что оценка единичных генных полиморфизмов цитокинов, которые участвуют в воспалении при туберкулезе, без учета их взаимодействий с другими генотипами является недостаточной и может привести к неправильной интерпретации, поскольку их совместное действие может иметь различные эффекты. Необходимо комплексное исследование межгенных взаимодействий, что будет способствовать развитию новых взглядов на профилактические и терапевтические подходы при туберкулезе легких.

Цель – определение комбинаций генов провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α и IL-6), ассоциированных с туберкулезом легких.

Материалы и методы

Выборка больных с туберкулезом легких состояла из 65 человек русской популяции Челябинской области, пациентов ГБУЗ «Челябинский областной клинический противотуберкулезный диспансер».

Выделение геномной ДНК из крови выполняли на колонках согласно инструкции производителя Ахуген (США). Генотипирование SNPs в генах исследуемых цитокинов осуществляли следующим образом: методом ПЦР в гене IL-6 (-174)*G/C (реактивы ООО НПФ «Литех», Москва), методом ПДРФ в генах TNF α (-308)*G/A

и TNF α (-238)*G/A (реактивы ИХБиФМ СО РАН, г. Новосибирск) и IL-1 β (+3953)*C/T (реактивы «Синтол», Москва, и Fermentas, США). Для детекции использовали электрофоретический метод в 3% агарозном геле.

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили, используя анализ межгенных взаимодействий. Для этого был выбран метод сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR), предложенный Hahn L.W и соавт. [6].

Программа формирует лучшие модели, для каждой из которых рассчитываются следующие параметры: воспроизводимость и точность предсказания. Модель с наиболее высокой воспроизводимостью (9/10) и точностью предсказания (не менее 70%) выбирается как оптимальная. На основе модели строятся дендрограмма и схема Фрухтермана–Рэйнгольда, которые позволяют визуализировать изучаемые межгенные взаимодействия и оценить значимость отдельных маркеров заболевания.

Результаты и обсуждение

В нашей работе мы провели анализ межгенных взаимодействий генов цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-6 у больных туберкулезом легких методом MDR с построением дендрограммы и схемы Фрухтермана–Рэйнгольда. Характеристики полученных моделей представлены в таблице 1.

В результате исследования взаимодействия генов мы получили трехкомпонентную модель IL-6 (-174)*C – IL-1 β (+3953)*T – IL-1 β (+3953)*C, с воспроизводимостью 10/10 и точностью предсказания 72%. В состав данной модели входят аллель IL-6 (-174)*C, связанный с низким уровнем продукции цитокина, и аллели IL-1 β (+3953)* с разнонаправленными эффектами. Исходя из точности предсказания и воспроизводимости тестируемых моделей, для данного анализа оптимальным межгенным взаимодействием является двухкомпонентная модель IL-6 (-174)*C-IL-1 β (+3953)*T, которая характеризуется воспроизво-

ТАБЛИЦА 1. МОДЕЛИ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

TABLE 1. MODELS OF INTERGENIC INTERACTIONS IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS

Модель Model	Точность предсказания в тестовой выборке Testing balanced accuracy	Воспроизводимость тестируемой модели Cross-validation (CV) consistency
IL-6 (-174)*C	0,6115	9/10
IL-1 β (+3953)*T – IL-6 (-174)*C	0,7446	10/10
IL-1 β (+3953)*T – IL-1 β (+3953)*C – IL-6 (-174)*C	0,7219	10/10
IL-1 β (+3953)*T – TNF α (-238)*A – IL-1 β (+3953)*C – IL-6 (-174)*C	0,7219	7/10

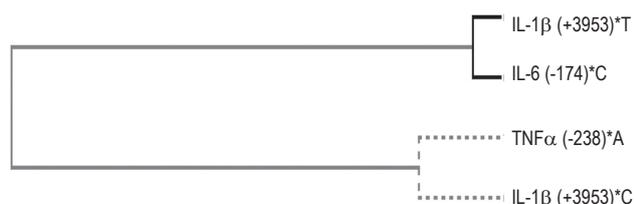


Рисунок 1. Дендрограмма межгенных взаимодействий
Figure 1. Dendrogram of intergenic interactions

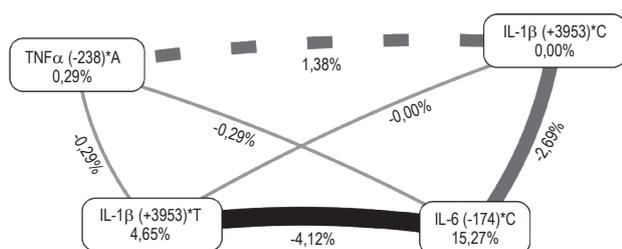


Рисунок 2. График энтропии (Фрухтерман–Рэйнгольд), отражающий межгенные взаимодействия в четырехлокусной модели

Примечание. На вершине многогранника представлена информационная ценность каждого маркера, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары генов. Черные линии – антагонизм, серые линии – синергизм, серые пунктирные линии – слабый синергический эффект, узкие серые линии – независимый эффект.

Figure 2. Graph of entropy (Fruchterman–Rheinbold), reflecting intergenic interactions in the four-locus model

Note. At the top of the polyhedron, the informational value of each marker is presented; on the edges, the informational value of the interaction of a pair of genes. Black lines - antagonism, gray lines - synergism, gray dashed lines - weak synergistic effect, narrow gray lines - independent effect.

димостью 10/10 и точностью предсказания 74%. Мы установили, что наибольшую значимость в данной модели имеет аллель IL-6 (-174)*C, отвечающий за сниженную продукцию цитокина.

Кроме текстового отображения результатов, программа позволяет представить результаты в виде графика дендрограммы, отображающие попарные взаимодействия локусов, что позволяет не только увидеть полиморфизмы, образующие модель, но и оценить вид и силу их взаимодействий (рис. 1).

Пары с более сильными взаимодействиями имеют меньшее расстояние из-за коротких линий, а со слабыми – большее. В данном рисунке черные линии характеризуют наиболее сильные антагонистические взаимодействия между генами IL-6 (-174)*C и IL-1β (+3953)*T, а серые прерывистые линии – слабые синергические взаи-

модействия между генами TNFα (-238)*A и IL-1β (+3953)*C.

С помощью схемы Фрухтермана–Рэйнгольда, предлагаемой программой, мы оценили информационную ценность отдельного маркера и комбинации генов (рис. 2).

По данной схеме мы установили, что межгенные взаимодействия локусов IL-1β (+3953)*T/IL-6 (-174)*C характеризуются долей фенотипической энтропии 4,12%, а эффект этих взаимодействий можно охарактеризовать как антагонистический. Кроме того, согласно схеме, между полиморфизмами IL-1β (+3953)*C и TNFα (-238)*A наблюдается умеренное, а между полиморфизмами IL-1β (+3953)*C и IL-6 (-174)*C сильное синергическое взаимодействие. Продукты данных генов отвечают за умеренный провоспалительный эффект.

Схема Фрухтермана–Рэйнгольда показала, что наибольшим предсказательным потенциалом из всех изучаемых генов обладает полиморфизм IL-6 (-174)*C – 15,27%.

Учитывая полученные данные, можно предположить, что большую роль при туберкулезе играют не столько отдельные аллели генов провоспалительных цитокинов, сколько их сочетания.

В результате исследования нами установлена трехлокусная модель IL-6 (-174)*C – IL-1β (+3953)*T – IL-1β (+3953)*C, в которой наибольшим предсказательным потенциалом обладает аллель IL-6 (-174)*C. Антагонистические взаимодействия IL-6 (-174)*C и IL-1β (+3953)*T, на долю которых приходится максимум фенотипической энтропии, могут быть объяснены тем, что, по литературным данным, IL-6 снижает экспрессию IL-1β и TNFα [10]. Вероятно, вклад SNP -174 IL-6 в развитие предрасположенности к туберкулезу среди исследуемых генов является максимальным. Тем не менее в исследованиях на европейских популяциях, в том числе и у русских Челябинской области, не было обнаружено достоверной ассоциации данного полиморфизма с туберкулезом легких [2, 9, 10, 11]. Учитывая его центральное положение в нашей модели, можно предположить регуляторную роль данного цитокина по отношению к другим провоспалительным цитокинам.

Исследования межгенных ассоциаций генов цитокинов, вовлеченных в иммунопатогенез туберкулеза, и составление на их основе генной цепи для конкретного больного помогут установить центральные гены и регуляторные [2, 5], что даст возможность предсказать тяжесть течения заболевания при активной форме, а также расширить знания об этиологии и патогенезе инфекции для оптимизации методов лечения и профилактики.

Список литературы / References

1. Беляева С.В., Сташкевич Д.С. Роль полиморфизмов гена TNFA в формировании различных вариантов воспалительного ответа при туберкулезе легких у русских Челябинской области // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 775-778. [Belyaeva S.V., Stashkevich D.S. The role of TNFA gene polymorphisms in the formation of different variants of the inflammatory response in pulmonary tuberculosis in russians of Chelyabinsk region. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 3, pp. 775-778. (In Russ.)]
2. Бурмистрова А.Л., Беляева С.В. Визуализация генетических комбинаций, участвующих в формировании воспалительного ответа при туберкулезе легких, методом канонического анализа соответствий // Вестник Челябинского государственного университета, 2015. № 21 (376). Биология. Вып. 3. С. 12-16. [Burmistrova A.L., Belyaeva S.V. Visualization of genetic combinations involved in the formation of the inflammatory response in tuberculosis of lungs, by canonical correspondence analysis. *Vestnik Chelyabinskogo gosudarstvennogo universiteta = Chelyabinsk State University Bulletin*, 2015, no. 21 (376), Biology, Iss. 3, pp. 12-16. (In Russ.)]
3. Васильева И.А., Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Стерликов С.А. Глобальные отчеты Всемирной организации здравоохранения по туберкулезу: формирование и интерпретация // Туберкулез и болезни легких, 2017. Т. 95. С. 7-16. [Vasilyeva I.A., Belilovsky E.M., Borisov S.E., Sterlikov S.A. WHO Global tuberculosis reports: compilation and interpretation. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, Vol. 95, no. 5, pp. 7-16. (In Russ.)]
4. Симбирцев А.С. Иммунофармакологические аспекты системы цитокинов // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 84-95. [Simbirtsev A.S. Immunopharmacological aspects of the cytokine system. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 84-95. (In Russ.)]
5. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Ситникова А.В., Бармина С.Э. Функциональный полиморфизм генов провоспалительных цитокинов при туберкулезе легких // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С.149-156. [Churina E.G., Urazova O.I., Novitsky V.V., Sitnikova A.V., Barmina S.E. Functional polymorphism of the pro-inflammatory cytokine genes in pulmonary tuberculosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 149-156. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-149-156.
6. Hahn L.W., Ritchie M.D., Moore J.H. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics*, 2003, Vol. 19, pp. 376-382.
7. Martinez A.N., Mehra S., Kaushal D. Role of interleukin 6 in innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 207, Iss. 8, pp. 1253-1261.
8. Singh P.P., Goyal A. Interleukin-6: a potent biomarker of mycobacterial infection. *SpringerPlus*, 2013, Vol. 2, 686. doi: 10.1186/2193-1801-2-686.
9. Sun Y., Wang M. Association between IL-6 gene polymorphisms and susceptibility of tuberculosis: evidence based on a meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2017, Vol. 10, no. 3, pp. 4297-4304.
10. Wu S., Wang M.-G., Wang Yu., He J.-Q. Polymorphisms of cytokine genes and tuberculosis in two independent studies. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, 2507. doi: 10.1038/s41598-019-39249-4.
11. Wu S., Wang Y., Zhang M., Shrestha S.-S., Wang M.-G., He J.-Q. Genetic polymorphisms of IL1B, IL6, and TNF α in a Chinese Han population with pulmonary tuberculosis. *BioMed Res. Int.*, 2018, Vol. 11, pp. 1-10.

Авторы:

Беляева С.В. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Сташкевич Д.С. — к.б.н., декан биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Бурмистрова А.Л. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Belyaeva S.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Stashkevich D.S., PhD (Biology), Dean, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Burmistrova A.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 11.04.2020

Отправлена на доработку 30.04.2020

Принята к печати 06.05.2020

Received 11.04.2020

Revision received 30.04.2020

Accepted 06.05.2020



18 мая 2020 года ушла из жизни Валентина Борисовна Гервазиева, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, замечательный Ученый и Учитель, Человек с неукротимой жадой познания нового, широким научным кругозором и неиссякаемой творческой активностью.

В 1962 году Валентина Борисовна закончила лечебный факультет Черновицкого медицинского института. Свой путь в науке Валентина Борисовна начинала в аллергологической лаборатории АМН СССР под руководством ученого с мировым именем, основоположника отечественной аллергологии А.Д. Адо. Андрей Дмитриевич оставался для нее Учителем, которого Валентина Борисовна с благодарностью и теплотой вспоминала всю свою жизнь, которую целиком посвятила дальнейшему развитию аллергологии и внедрению в медицинскую практику современных достижений аллергологии и иммунологии.

В 1968 году Валентина Борисовна защитила кандидатскую диссертацию, в 1984 — докторскую. Более 50 лет Валентина Борисовна работала в НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, где в 1989 году создала и возглавила лабораторию аллергодиагностики, оставаясь ее бессменным руководителем.

Валентина Борисовна была ведущим специалистом в области аллергологии и иммунологии, возглавляя в НИИВС им. И.И. Мечникова научное направление по изучению факторов внешней среды, способствующих формированию чувствительного к аллергии фенотипа у детей. Под ее руководством были разработаны технологии получения новых аллергологических диагностических тест-систем и препаратов для профилактики и лечения аллергии. По инициативе Валентины Борисовны были созданы иммуноферментные системы для диагностики аллергических заболеваний и оценки эффективности иммунотерапии у больных аллергическими заболеваниями. Заслугой Валентины Борисовны было внедрение в экспериментальные и диагностические исследования максимально очищенных аллергенов различного происхождения.

Валентна Борисовна — автор более 300 научных работ, опубликованных в ведущих отечественных и зарубежных изданиях. Она создала научную школу аллергологов, работающих в различных регионах России и за рубежом. Под ее руководством успешно защищены более 30 докторских и кандидатских диссертаций.

За вклад в развитие медицинской науки и практику здравоохранения Валентина Борисовна награждена знаком «Отличник здравоохранения», медалями «Ветеран труда», «В память 850-летия Москвы», Почетной грамотой Российской академии медицинских наук. За многолетнюю плодотворную деятельность награждена памятными медалями И.И. Мечникова в честь 90-летия и 100-летия НИИВС им. И.И. Мечникова.

Среди коллег-иммунологов Валентина Борисовна известна своей уникальной эрудицией, глубокими знаниями, профессиональной интуицией. В течение жизни, наполненной напряженной любимой работой, Валентина Борисовна реализовалась в полной мере. В памяти учеников и сотрудников она останется примером подвижничества в науке.

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 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. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

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 представится 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 содержанию 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

Ажикина Т.Л.	779	Инвиева Е.В.	751	Назаров П.Г.	657	Сташкевич Д.С.	811
Александрова Е.П.	633	Кажарова С.В.	791	Никитин А.В.	729	Сурков А.Н.	717
Андреева И.И.	799	Картунен А.А.	657	Николаева М.А.	751	Тарасова Т.В.	693
Арискина О.Б.	729	Коваленко Е.И.	779	Орлова Е.А.	685	Тетруашвили Н.К.	751
Арсентьева Н.А.	765	Козлов В.А.	785	Осипова И.В.	729	Тимошкин В.О.	693
Балабас О.А.	633	Кологривова Е.Н.	741	Останин А.А.	625, 675	Тихонова М.А.	675
Бацунов О.К.	765	Кольцова Е.А.	665	Петричук С.В.	717	Топтыгина А.П.	717
Беляева С.В.	811	Кондаков А.Е.	785	Петроченко С.Н.	685	Тотоян Арег А.	765
Березкина М.Э.	633	Кореневский А.В.	633	Пивоварова Л.П.	729	Тулупов А.Н.	729
Бойко А.А.	779	Костинов М.П.	791	Плешко Р.И.	741	Уварова О.С.	665
Борисов А.Г.	785	Кречетова Л.В.	751	Порядин Г.В.	693	Филатенкова Т.А.	647
Борисова О.В.	805	Крылов А.С.	685	Потапов А.С.	717	Филиппова Ю.Ю.	703
Бурмистрова А.Л.	703, 811	Кудрявцев И.В.	785	Пронкина Н.В.	675	Фомичева Е.Е.	647
Вавилова Ю.Д.	779	Кудрявцева Г.В.	657	Савченко А.А.	785	Хайдар Д.А.	693
Ванько Л.В.	751	Кудряшова А.М.	805	Сапожников А.М.	779	Черных Е.Р.	625, 675
Вторушина В.В.	751	Лапшин В.Н.	729	Сахро Л.В.	625	Чичинкас Э.	741
Гаврилова Н.Ф.	805	Леплина О.Ю.	675	Свиридов В.В.	805	Шанин С.Н.	647
Ганковская Л.В.	665	Любимова Н.Е.	765	Свитич О.А.	665	Шевела Е.Я.	625, 675
Греченко В.В.	665	Максимова А.А.	625	Сельков С.А.	633	Ширинский В.С.	609
Гречихина М.В.	779	Маленков Ю.А.	657	Семенов А.В.	765	Ширинский И.В.	609
Громов М.И.	729	Мальшев М.Е.	729	Семикина Е.Л.	717	Шишкин В.В.	657
Громова Т.В.	665	Маркелова Е.В.	729	Серебряная Н.Б.	647	Шишкин В.И.	657
Данилова Д.И.	799	Маркова К.Л.	633	Сизякина Л.П.	799	Штоббе А.А.	675
Демина М.Д.	665	Михайлова Н.А.	805	Соколов Д.И.	633	Шустова О.А.	779
Захватов А.Н.	693	Морозов С.А.	675	Солдатенкова А.В.	805	Щербик Н.В.	741
Зорин Н.А.	791	Мосейкин И.А.	685	Староха А.В.	741	Щербицкая А.Д.	633
Зорина В.Н.	791	Мягкова М.А.	685	Стаховская Л.В.	665	Яковлева И.В.	805

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптивный иммунитет	609	инфламэйджинг	609	серотонин	685
антитела	718	исходы	676	синовит	694
апоптоз	658	ишемический инсульт	666, 676	системная красная волчанка	658
аутофагия	658	клетки иммунной системы	800	системная склеродермия	658
белки теплового шока	779	кортикостерон	647	старение	609
болезнь Крона	718	кровотворение	730	тестостерон	647
В-лимфоциты	785	ксефокам	694	травма сустава	694
вакцина	805	лактоферрин	792	туберкулез легких	811
внебольничная пневмония	792	макрофаги	625	фагоциты	741
воспаление	634, 666, 694	матриксные металлопротеиназы	625	фенотипическая пластичность	704
воспалительные заболевания		межгенные взаимодействия	811	фиброз	625
кишечника	718	метод сокращения многофакторной		хемокины	766
врожденный иммунитет	609, 666	размерности	811	хроническая антигенная нагрузка	609
ген <i>HSPA1B</i>	779	миелопероксидаза	741	хронический болевой синдром	685
генетический полиморфизм	811	микровезикулы	634	цитокиновый профиль	694
гибридный рекомбинантный белок		мультиплексный анализ	766	цитокины	625, 704, 741, 751, 766
OrgF-aTox-OrgI	805	нейрогормоны	704	цитотоксические Т-лимфоциты	785
гипопротеинемия	730	некрот	658	экспериментальная черепно-мозговая	
дезоксирибонуклеат натрия	730	нормальные значения	766	травма	647
дети	704	ОВИН	800	экссудативный средний отит	741
детский возраст	741	озонотерапия	694	язвенный колит	718
дофамин	685	осложнения	730	BDNF	647
естественные антитела	685	полиморбидность	609	CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	676
естественные киллеры	634	полиморфизмы	779	CD4 ⁺ IFN γ ⁺	676
заместительная терапия ВВИГ	800	политравма	730	FoxP3 ⁺	751
здоровые жители	766	поляризация макрофагов	625	GP2	718
иммунитет	785	привычный выкидыш	751	MALDI-TOF-масс-спектрометрия	634
иммунный ответ	634	пробиотик «Проваг»	785	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	805
иммуноглобулины	785	провоспалительные цитокины	811	rIL-2	647
иммуномодуляторы	792	протеом	634	Т-хелперы	785
иммуоферментный анализ	685, 805	противоинфекционная защита	730	Th17	751
иммуоцитотерапия	751	расстройства аутистического спектра ..	704	TLR2	666
ингибиторы гидролаз	792	расстройства шизофренического		TLR4	666
ингибиторы матриксных		спектра	704	Toll-подобные рецепторы	666
металлопротеиназ	625	ревматоидный артрит	658	Treg	751
интраназальная иммунотерапия	741	Республика Гвинея	766		



XII Всероссийская школа по клинической иммунологии «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

Тематика «Инфекционная Иммунология»

31 января – 6 февраля 2021 года
Пушкинские Горы, Псковская область

Организаторы:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Российская Академия Наук

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

Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга
Администрация Псковской области

ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России
Институт экспериментальной медицины
НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора
Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Российское научное общество иммунологов
Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов
Российское цитокиновое общество
Ассоциация специалистов и организаций
лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»
Санкт-Петербургское региональное отделение Всероссийской Общественной
Организации – Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов

В программе школы:

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

Пакет слушателя включает:

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

Всем слушателям будут выданы удостоверения о тематическом усовершенствовании установленного образца и зарегистрированные на сайте НМО www.sovetnmo.ru получают 14 зачетных единиц (кредитов) по специальности: «аллергология и иммунология»

Координатор проекта:

Председатель СПб РО РААКИ, академик РАН, Тотолян Арег Артемович

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

тел./факс: (812) 232-00-66

e-mail: totolian@spbraaci.ru

Заявки подавать до 1 декабря 2020 года.

Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна

Тел./факс: (812) 233-08-58

e-mail: shkola@spbraaci.ru

Адрес для корреспонденции: 197101, Санкт-Петербург, а/я 130, СПб РО РААКИ

www.spbraaci.ru

www.allergologi-immunologi.ru



ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

ISSN 1563-0625



9 771563 062002 >