

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

Том 22, № 5. С. 821-1028

2020

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



Фиразир®

икатибант

ЛЕЧЕНИЕ ПРИСТУПОВ НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОНЕВРОТИЧЕСКОГО ОТЕКА



Готов к применению



Может применяться у детей с 2-летнего возраста



Вводится подкожно, самостоятельно



Хранится при комнатной температуре

Фиразир®

Регистрационный номер: ЛСР-008206/09. **Международное непатентованное название:** Икатибант. **Лекарственная форма:** раствор для подкожного введения. **Фармакотерапевтическая группа:** брадикининовых B2-рецепторов селективный антагонист. **Фармакологические свойства:** **Фармакодинамика:** Икатибант является селективным конкурентным антагонистом рецепторов брадикинина типа 2 (B2). Представляет собой синтетический дивалентид, по химической структуре близкий брадикинину, но имеющий в составе 5 непереносимых аминокислот. Повышение концентрации брадикинина является ключевым медиатором развития клинических симптомов острого приступа НАО. Установлено, что икатибант проявляет свойства конкурентного антагониста даже в случае увеличения разрешающей дозы брадикинина в 4 раза. **Показания к применению:** Препарат Фиразир® показан для симптоматического лечения острых приступов наследственного ангионевротического отека (обусловленного дефицитом ингибитора С₁-эстеразы) у взрослых, подростков и детей в возрасте 2 лет и старше. **Противопоказания:** Повышенная чувствительность к компонентам препарата (активному веществу и вспомогательным веществам). Одновременный прием ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента. Детский возраст до 2 лет или масса тела пациента менее 12 кг (эффективность и безопасность применения не установлены). **С осторожностью:** У пациентов при обострении ишемической болезни сердца или нестабильной стенокардии; в первые недели после инсульта (см. «Особые указания»). **Применение при беременности и в период грудного вскармливания:** Беременность. Клинические данные о применении икатибанта в период беременности отсутствуют. Данные доклинических исследований указывают на неблагоприятное влияние препарата на процесс имплантации плодного яйца и на родоразрешение, но потенциальный риск для человека не определен. Препарат Фиразир® может применяться при беременности только после тщательной оценки соотношения польза/риск для матери и плода, например, для лечения угрожающего жизни приступа НАО, сопровождающегося отеком гортани. **Грудное вскармливание.** Неизвестно, проникает ли икатибант в грудное молоко человека, поэтому после применения препарата Фиразир® у кормящей пациентки следует исключить кормление грудью на последующие 12 часов. **Фертильность.** Не отмечено клинически значимых изменений базальной и гормон-стимулированной концентрации половых гормонов как у женщин, так и у мужчин. **Способ применения и дозы:** Препарат Фиразир® предназначен для подкожного введения, предпочтительно – в область передней брюшной стенки. Применение препарата проводят под контролем квалифицированного медицинского сотрудника. Решение о возможности самостоятельного введения препарата Фиразир® пациентом или лицом, осуществляющим уход за ним, принимает врач, имеющий опыт диагностики и лечения НАО. Пациенты с клинически проявляющимся отеком гортани должны быть экстренно госпитализированы, им следует находиться под наблюдением врача до полного купирования приступа НАО. Шприц, содержащий препарат Фиразир®, предназначен только для однократного применения. **Дозы/Дозы:** Рекомендуемая доза для взрослых – однократная подкожная инъекция 30 мг препарата Фиразир®. В большинстве случаев однократного введения препарата Фиразир® достаточно для купирования симптомов НАО. В случае недостаточной эффективности или рецидива приступа НАО можно ввести препарат Фиразир® повторно через 6 часов. Если после повторного введения препарата симптомы НАО сохраняются или приступ НАО рецидивирует, третья инъекция препарата может быть выполнена еще через 6 часов. Не рекомендуется превышать максимальную суточную дозу препарата – 90 мг (3 инъекции препарата). **Педиатрическая популяция.** Рекомендуемая доза препарата Фиразир®, рассчитанная с учетом массы тела ребенка и подростка (в возрасте 2 года – 17 лет), указана в Таблице 1. Если остаются сомнения в отношении извлекаемого объема препарата, нужно обратиться к врачу. Режим дозирования для педиатрической популяции. **Масса тела/Доза (Объем инъекции):** 12 кг – 25 кг / 10 мг (1,0 мл); 26 кг – 40 кг / 15 мг (1,5 мл); 41 кг – 50 кг / 20 мг (2,0 мл); 51 кг – 65 кг / 25 мг (2,5 мл); >65 кг / 30 мг (3,0 мл) – в рамках КИ применили не более 1 инъекции препарата Фиразир® для лечения приступа НАО. **Пожилые:** Данные о применении препарата Фиразир® в группе пациентов старше 65 лет ограничены. Установлено, что у пожилых пациентов системная экспозиция икатибанта повышена, однако клиническая значимость данного наблюдения в отношении безопасности препарата Фиразир® не определена. **Способ применения:** Взрослые. Препарат Фиразир® может быть введен самостоятельно пациентом или лицом, осуществляющим уход за ним, только после обучения технике выполнения подкожных инъекций под контролем медицинского сотрудника. **Дети и подростки в возрасте 2–17 лет.** Препарат Фиразир® может быть введен лицом, осуществляющим уход за пациентом, только после обучения технике выполнения подкожных инъекций под контролем медицинского сотрудника. **Побочное действие НЛР, сообщения о которых были получены на фоне применения икатибанта:** очень часто (≥1/10): реакции в месте введения (в месте введения кровоподтеки, гематомы, ощущение жжения, покраснение кожи, снижение и отсутствие чувствительности кожи, раздражение кожи, припухлость, боль, ощущение расширения, зуд, отек, крапивница и ощущение тепла); часто (≥1/100–<1/10): головноекружение, головная боль, тошнота, сыпь, покраснение, зуд, повышение температуры тела (лифесия), повышение активности печеночных трансаминаз; частота неизвестна (не может быть установлена по имеющимся данным): общие расстройства и нарушения в месте введения. **Лабораторные показатели:** У большинства детей и подростков, которых лечили с помощью подкожных инъекций икатибанта, были отмечены нежелательные реакции в месте введения препарата, такие как покраснение и отек кожи, зуд, боль и ощущение жжения; эти НЛР были от легкой до средней степени тяжести и были схожими с НЛР зарегистрированными у взрослых. **Перечень всех побочных эффектов представлен в инструкции по медицинскому применению.** **Передозировка.** Не отмечено случаев передозировки препарата Фиразир®. **Взаимодействие с другими лекарственными средствами.** Фармакокинетические взаимодействия препарата Фиразир® с изосферментами (СУР) цитохрома P450 не предполагаются. В связи с повышением брадикинина в плазме крови у пациентов с НАО, совместное применение препарата Фиразир® и ингибиторов АПФ противопоказано. **Особые указания.** Препарат следует применять с осторожностью при самостоятельном введении в амбулаторных условиях. Пациентам, которые прежде не получали препарат Фиразир®, первое введение следует проводить в медицинском учреждении или под руководством врача. В случае недостаточного эффекта препарата или рецидива приступа после введения препарата пациентом или лицом, осуществляющим уход за ним, рекомендуется обратиться к врачу. При неэффективности первой инъекции для лечения приступа повторные введения препарата взрослым пациентам должны проводиться в медицинском учреждении. Данные о повторном введении препарата при неэффективности первой инъекции для лечения приступа у детей и подростков нет. Обязательна госпитализация пациентов с симптомами отека гортани, в том числе в случаях, когда приступ купировался после самостоятельного введения препарата в амбулаторных условиях. **Влияние на способность управления транспортными средствами, механизмами.** Фиразир® обладает незначительным влиянием на способность к управлению транспортными средствами и механизмами. Пациентам в период лечения следует воздержаться от вождения автотранспорта и управления механизмами, если они чувствуют усталость или головноекружение. **Условия отпуска:** Отпускают по рецепту.

Организация, уполномоченная владельцем регистрационного удостоверения лекарственного препарата для медицинского применения на принятие претензий от потребителей:
 ООО «Шайер Биотек Рус», Российская Федерация, 119021, г. Москва, ул. Тимур Фрунзе, д. 11, стр. 1, этаж 6, пом. 1, ком. 6, 8; 12. Тел.: +7 (495) 787-04-77. Факс: +7 (495) 787-04-78

**Полная информация по препарату представлена в инструкции по медицинскому применению препарата (ИМП).
 Настоящая сокращенная инструкция по применению (СИП) представлена исключительно в информационных целях
 и не может служить в качестве исчерпывающего руководства при назначении и применении препарата.
 СИП (V.4) от 03.04.2019 на основании ИМП от 11.03.2019**

НАО – наследственный ангионевротический отек.
 Инструкция по медицинскому применению препарата ФИРАЗИР® от 10.01.2018, ЛСР-008206/09 от 16.10.2009; URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=4094bd77-32a0-4eb6-bb9d-1e828c401127&t=b869d75e-9b75-4a38-b87b-7261de60bbe3.

ООО «Шайер Биотек Рус» – часть биофармацевтической компании «Такеда»
 119021, г. Москва, ул. Тимур Фрунзе, д. 11, стр. 1, этаж 6, пом. 1, ком. 6, 8; 12;
 тел.: +7 (495) 787-04-77, www.takeda.com C-APROM/RU/0396
 Материал предназначен только для медицинских работников.



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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

сентябрь-октябрь

2020, том 22

№ 5

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

Горячкина Людмила Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической аллергологии Российской медицинской академии последиplomного образования Минздрава России, Москва, Россия

Кашкин Кирилл Павлович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последиplomного 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 30.09.2020 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 26. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1097

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**

September-October

2020, volume 22

No. 5

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Editorial Board

Ludmila A. Goriachkina – PhD, MD, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Clinical 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 30.09.2020. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

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

Print in LLC «ARTEMIDA»

199178, Russian Federation, St. Petersburg, 8 line of 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

Бозрова С.В., Друцкая М.С., Недоспасов С.А.

ЛЕКАРСТВА ПРОТИВ COVID-19: ОТ МИФОВ К РЕАЛИЯМ И НАДЕЖДАМ..... 827

Оригинальные статьи

Блинова Е.А., Колерова А.В., Балясников В.Е., Козлов В.А.

ПОДДЕРЖАНИЕ CD4⁺ ЦЕНТРАЛЬНЫХ И ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК ПАМЯТИ В НОРМЕ И В МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ *IN VITRO*..... 837

Абрамова Т.Я., Блинова Е.А., Гришина Л.В., Чумасова О.А., Сулутьян А.Э., Сизиков А.Э., Козлов В.А.

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕАВТОНОМНЫХ ЭФФЕКТОВ АПОПТОЗА В ПРОЦЕССЕ ИНИЦИИ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК *IN VITRO* У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ 847

Бердюгина О.В.

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ЗАВИСИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ИНТЕГРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИММУННЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНОГО ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ СУЩЕСТВОВАНИЯ ТУБЕРКУЛЕМЫ ЛЕГКОГО?..... 867

Шолан Р.Ф.

НЕЙРОИММУННЫЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В МОЧЕВОМ ПУЗЫРЕ ПРИ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОМ ЦИСТИТЕ/СИНДРОМЕ БОЛЕЗНЕННОГО МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ..... 879

Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ФЕНОТИПА И МЕТАБОЛИЗМА НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ..... 887

Смирнова О.В., Цуканов В.В., Синяков А.А., Москаленко О.Л., Елманова Н.Г., Овчаренко Е.С.

ОСОБЕННОСТИ ХАРАКТЕРА КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ – АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ИММУННОЙ РЕГУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ АТРОФИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ И РАКОМ ЖЕЛУДКА 897

Терещенко С.Ю., Смольникова М.В., Каспаров Э.В., Шахтинейдер Е.В., Малинчик М.А., Коноплева О.С., Смирнова С.В.

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА *IL13* В РАЗВИТИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ 907

Супрун Е.Н., Наговицына Е.Б., Кудерова Н.И., Супрун С.В., Лебедько О.А.

НЕКОТОРЫЕ АССОЦИИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *Tol1*-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И ИХ КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ..... 915

Смольникова М.В., Барило А.А., Малинчик М.А., Смирнова С.В.

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ПСОРИАЗУ И ПСОРИАТИЧЕСКОМУ АРТРИТУ 925

Ширинский В.С., Калиновская Н.Ю., Филатова Е.Ю., Ширинский И.В.

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЬНЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ ФЕНОТИПОМ ОСТЕОАРТРИТА: ПОИСКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 933

Нероев В.В., Балацкая Н.В., Новикова А.Ю., Рябина М.В., Илюхин П.А.

ИЗВЕСТНЫЕ И МАЛОИЗУЧЕННЫЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ И ВАЗОАКТИВНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА ПРИ КАПИЛЛЯРНОЙ ГЕАНГИОМЕ СЕТЧАТКИ..... 943

Золотых В.Г., Гвоздецкий А.Н., Ким А.Я., Лапин С.В., Михайлова Л.Р., Старовойтова Е.М., Федоткина Т.В., Чурилов Л.П., Шенфельд И., Яблонский П.К.

ВЛИЯНИЕ СИЛИКОНОВОЙ МАММОПЛАСТИКИ НА ИММУНОЭНДОКРИННЫЙ СТАТУС ЖЕНЩИН-РЕЦИПИЕНТОК..... 957

Пичугова С.В., Рыбина И.В., Бейкин Я.Б.

ДИНАМИКА УРОВНЯ АНТИСПЕРМАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ У ПОДРОСТКОВ С ЛЕВОСТОРОННИМ ВАРИКОЦЕЛЕ..... 969

Бочкова М.С., Тимганова В.П., Храмов П.В., Ужвиюк С.В., Шардина К.Ю., Нечаев А.И., Раев М.Б., Заморина С.А.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ЛЮМИНОЛ-ЗАВИСИМУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА 977

Краткие сообщения

Железко В.В., Новикова И.А.

ПАРАМЕТРЫ НЕТОЗА У ПАЦИЕНТОВ С СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ 987

Лазарева Н.М., Баранова О.П., Кудрявцев И.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А.

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ САРКОИДОЗЕ 993

Полозова Э.И., Пузанова Е.В., Сеськина А.А.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ГИПОКСИИ И ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ 1003

Мироманов А.М., Забелло Т.В., Мироманова Н.А.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *IL4-589C>T*, *FCGR2A-166His>Arg*, *DEFB1-20G>A*, *DEFB1-52G>A* НА СОДЕРЖАНИЕ *TNFα*, *IL-1β*, *IL-4* И *IL-10* У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНЫМ ОСТЕОАРТРОЗОМ ТАЗОБЕДРЕННЫХ СУСТАВОВ..... 1009

Иммунологические методы

Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Логвиненко О.В., Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Буравцева Н.П., Тюменцева И.С.,

Курчева С.А., Куличенко А.Н.

ПРИМЕНЕНИЕ CAS-ТЕСТА ДЛЯ ОЦЕНКИ У ЛЮДЕЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ К ВОЗБУДИТЕЛЮ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ..... 1017

Правила для авторов 1025

Авторский указатель 1028

Предметный указатель 1028

CONTENTS

Reviews

Bozrova S.V., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A.

COVID-19 THERAPY: FROM MYTHS TO REALITY AND HOPES 827

Original articles

Blinova E.A., Kolerova A.V., Kolerova A.V., Kozlov V.A.

IN VITRO MAINTAINING OF CD4⁺ CENTRAL AND EFFECTOR MEMORY CELLS IN NORMAL AND INFLAMMATORY CONDITIONS 837

Abramova T.Ya., Blinova E.A., Grishina L.V., Chumasova O.A., Sulutyan A.E., Sizikov A.E., Kozlov V.A.

STUDIES OF NON-AUTONOMOUS EFFECTS OF APOPTOSIS IN THE COURSE OF IN VITRO APOPTOTIC CELL DEATH INITIATION IN HEALTHY PERSONS AND PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS 847

Berdyugina O.V.

IS THERE A DEPENDENCE BETWEEN EXPRESSION OF INTEGRIN RECEPTORS BY PERIPHERAL BLOOD IMMUNE CELLS AND DURATION OF TUBERCULOUS GRANULOMA EXISTENCE IN THE PATIENTS? 867

Sholan R.F.

RELATIONSHIPS BETWEEN URINARY NEURAL AND IMMUNE FACTORS IN THE PATIENTS WITH INTERSTITIAL CYSTITIS/ BLADDER PAINFUL SYNDROME 879

Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V.

HYPEREXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTOR 2 AND TOLL-LIKE RECEPTOR 4 IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE IN ACUTE PERIOD OF THE DISEASE 887

Smirnova O.V., Tsukanov V.V., Sinyakov A.A., Moskalenko O.L., Elmanova N.G., Ovcharenko E.S.

TYPICAL RELATIONSHIPS BETWEEN THE INDEXES OF LIPID PEROXIDATION/ANTIOXIDANT PROTECTION AND IMMUNE REGULATION IN THE PATIENTS WITH CHRONIC ATROPHIC GASTRITIS AND STOMACH CANCER 897

Tereshchenko S.Yu., Smolnikova M.V., Kasparov E.V., Shakhshneider E.V., Malinchik M.A., Konopleva O.S., Smirnova S.V.

ROLE OF IL13 GENE POLYMORPHISM IN DEVELOPMENT OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN 907

Suprun E.N., Nagovitsyna E.B., Kuderova N.I., Suprun S.V., Lebed'ko O.A.

SOME GROUPS OF TOLL-LIKE RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AND THEIR CLINICAL AND PATHOGENETIC MANIFESTATIONS IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA 915

Smolnikova M.V., Barilo A.A., Malinchik M.A., Smirnova S.V.

SEARCH FOR GENETIC MARKERS OF PREDISPOSITION TO PSORIASIS AND PSORIATIC ARTHRITIS 925

Shirinsky V.S., Kalinovskaya N.Yu., Filatova E.Yu., Shirinsky I.V.

COMBINATION TREATMENT OF PATIENTS WITH METABOLIC PHENOTYPE OF OSTEOARTHRITIS: AN EXPLORATORY STUDY 933

Neroev V.V., Balatskaya N.V., Novikova A.Yu., Ryabina M.V., Ilyukhin P.A.

PROVEN AND LESS STUDIED HEMATOPOIETIC AND VASOACTIVE GROWTH FACTORS IN RETINAL CAPILLARY HEMANGIOMA 943

Zolotykh V.G., Gvozdetzky A.N., Kim A.Ya., Lapin S.V., Mikhailova L.R., Starovoitova E.M., Fedotkina T.V., Churilov L.P., Shoenfeld Y., Yablonsky P.K.

INFLUENCE OF SILICONE MAMMOPLASTY ON THE IMMUNOENDOCRINE STATUS OF FEMALE RECIPIENTS 957

Pichugova S.V., Rybina I.V., Beikin Ya.B.

DYNAMICS OF SPERM ANTIBODY LEVELS IN ADOLESCENTS WITH LEFT-SIDED VARICOCELE 969

Bochkova M.S., Timganova V.P., Khramtsov P.V., Uzhviyuk S.V., Shardina K.Yu., Nechaev A.I., Raev M.B., Zamorina S.A.

STUDY OF THE GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES EFFECT ON LUMINOL-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE OF HUMAN LEUKOCYTES 977

Short communications

Zhelezko V.V., Novikova I.A.

NETOSIS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS 987

Lazareva N.M., Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A.

FEATURES OF CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH SARCOIDOSIS 993

Polozova E.I., Puzanova E.V., Seskina A.A.

RELATIONSHIP BETWEEN IMMUNOLOGICAL ALTERATIONS, HYPOXIA AND INFLAMMATION IN ARTERIAL HYPERTENSION COMBINED WITH METABOLIC SYNDROME 1003

Miromanov A.M., Zabello T.V., Miromanova N.A.

EFFECT OF IL4-589C>T, FCGR2A-166His>Arg, DEFB1-20G>A, DEFB1-52G>A GENE POLYMORPHISMS ON TNF α , IL-1 β , IL-4, AND IL-10 CONTENTS IN THE PATIENTS WITH PRIMARY HIP OSTEOARTHRITIS 1009

Immunological methods

Ponomarenko D.G., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Logvinenko O.V., Ryazanova A.G., Aksenova L. Yu., Buravtseva N.P., Tyumentseva I.S., Kurcheva S.A., Kulichenko A.N.

USING CAST-TEST TO INVESTIGATE HUMAN SPECIFIC HYPERSENSITIVITY TO THE ANTHRAX PATHOGEN 1017

Instructions to Authors

..... 1025

Author index

..... 1028

Subject index

..... 1028

ЛЕКАРСТВА ПРОТИВ COVID-19: ОТ МИФОВ К РЕАЛИЯМ И НАДЕЖДАМ

Бозрова С.В.¹, Друзцкая М.С.¹, Недоспасов С.А.^{1, 2, 3}

¹ ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

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

³ Научно-технологический университет «Сириус», г. Сочи, Россия

Резюме. Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, оказалась беспрецедентной для XXI века и уже затронула страны с суммарным населением в миллиарды человек. Число инфицированных уже превысило 30 миллионов человек, а число погибших перевалило за миллион. К сожалению, Россия пока входит в пятерку стран с наибольшим числом зараженных, хотя смертность от COVID-19 существенно ниже, чем во многих других странах. Поскольку вирус и вызываемый им патогенез имеют много новых и неожиданных черт, наукоемкие и специфичные именно для этого вируса лекарства и вакцины еще не созданы. В качестве мишеней будущих лекарств наиболее перспективны ферменты, необходимые для жизненного цикла именно этого вируса (такие как компоненты репликационного комплекса и вирусные протеазы). Форс-мажорные обстоятельства вынудили провести оценку целого ряда ранее разработанных лекарств, направленных против других РНК-содержащих вирусов, причем некоторые из них уже показали эффективность при клинических испытаниях против SARS-CoV-2. Не вызывает сомнения, что в скором времени будут найдены прототипы лекарств этого класса с более высокой специфичностью и эффективностью. Другую группу потенциальных лекарств представляют известные препараты, направленные против различных аспектов патогенеза, вызываемого SARS-CoV-2, в частности «цитокинового шторма» или коагулопатии. Следует подчеркнуть, что геном вируса кодирует около 10 дополнительных белков, часть из которых могут иметь отношение к необычным сторонам патогенеза при COVID-19. Проводимые фундаментальные исследования должны определить, какие из этих белков могут стать мишенями для специфической терапии. Наконец, тот факт, что в плазме крови многих переболевших находятся нейтрализующие антитела, которые можно использовать для профилактики и терапии COVID-19, во-первых, указывает на перспективность рекомбинантных нейтрализующих антител как лекарств и, во-вторых, подтверждает реальность создания профилактических вакцин. Этот мини-обзор посвящен обсуждению терапевтических подходов и статуса клинических испытаний с использованием препаратов, которые уже существовали до начала пандемии и исходно были разработаны против других инфекционных агентов или для лечения аутоиммунных патологий. Именно эти лекарства входят в сегодняшний арсенал средств и терапевтических протоколов, с помощью которых сейчас в разных странах пытаются справиться с эпидемией COVID-19.

Ключевые слова: противовирусная терапия, коронавирус, SARS-CoV-2, пандемия

Адрес для переписки:

Недоспасов Сергей Артурович
ФГБУН «Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32
Тел.: 8 (499) 135-99-64
E-mail: info@eimb.ru

Address for correspondence:

Nedospasov Sergei A.
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy
of Sciences
119991, Russian Federation, Moscow, Vavilova str., 32
Phone: 7 (499) 135-99-64
E-mail: info@eimb.ru

Образец цитирования:

С.В. Бозрова, М.С. Друзцкая, С.А. Недоспасов
«Лекарства против COVID-19: от мифов к реалиям
и надеждам» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22,
№ 5. С. 827-836.

doi: 10.15789/1563-0625-CTF-2095

© Бозрова С.В. и соавт., 2020

For citation:

S.V. Bozrova, M.S. Drutskaya, S.A. Nedospasov "COVID-19
therapy: from myths to reality and hopes", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 5, pp. 827-836.

doi: 10.15789/1563-0625-CTF-2095

DOI: 10.15789/1563-0625-CTF-2095

COVID-19 THERAPY: FROM MYTHS TO REALITY AND HOPES

Bozrova S.V.^a, Drutskaya M.S.^a, Nedospasov S.A.^{a, b, c}

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russian Federation

Abstract. The COVID-19 pandemic, caused by the SARS-CoV-2 coronavirus, is unprecedented for the 21st century and has already affected countries with a total population of billions of people. The number of infected has already surpassed 30 million people and the number of deaths has exceeded 1 million. Unfortunately, Russia is still one of the five countries with the largest number of infected people, although mortality from COVID-19 is significantly lower than in many other countries. Since the virus and the pathogenesis caused by it have a lot of new and unexpected features, high-tech and specific anti-viral drugs and vaccines have not yet been created. The most promising targets for future drug development are enzymes necessary for the life cycle of this particular virus (such as components of the replicase complex or viral proteases). Unexpected circumstances are pushing the evaluation of a number of previously developed and existing drugs directed toward other RNA viruses, some of which have already been shown effective in clinical trials against SARS-CoV-2. There is no doubt that soon prototypes of drugs of this class with higher specificity and effectiveness will be found. Another group of potential drugs are known drugs that are directed against various aspects of the pathogenesis caused by SARS-CoV-2, in particular, cytokine storm or coagulopathy. It should be emphasized that the genome of the virus encodes about 10 additional proteins, some of which may be related to unusual aspects of pathogenesis during COVID-19. Basic research should determine which of these proteins can be targets for specific therapy. Finally, the fact that neutralizing antibodies are found in the blood plasma of many patients and can be used for the prevention and treatment of COVID-19, indicates the potential of using recombinant neutralizing antibodies as drugs, and secondly, confirms the possibility of creating effective vaccines. This mini-review discusses therapeutic approaches and the status of clinical trials using drugs that already existed before the pandemic and were originally developed against other infectious agents or for the treatment of autoimmune pathologies. These drugs are part of today's arsenal in therapeutic protocols and are used in an attempt to cope with the COVID-19 epidemic in different countries.

Keywords: antiviral therapy, coronavirus, SARS-CoV-2, pandemic

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-60338.

SARS-CoV-2 представляет собой РНК-содержащий вирус, предположительно летучих мышей, который через промежуточного хозяина или напрямую сумел адаптироваться к клеткам человека. Как и близкий к нему по структуре SARS-CoV, а также вирус MERS-CoV, он относится к бета-коронавирусам и вызывает у человека тяжелую и атипичную форму пневмонии. Классификация коронавирусов, особенности бета-коронавирусов и их природных хозяев подробно представлены в недавнем обзоре [1].

Геном SARS-CoV-2 довольно протяженный — около 30 тысяч нуклеотидов, что делает его одним из самых больших по длине генома РНК-содержащих вирусов. Как и у большинства вирусов, этот геном эффективно используется, кодируя более 20 вирусных белков (некоторые из них образуются после протеолитического расщепления длинного предшественника). Главные из них — ферменты репликазного комплекса (РНК-зависимая РНК-полимераза, хеликаза, прай-

маза и протеаза), 4 структурных белка вириона, включая S-белок (белок «шипа»), а также около 10 вспомогательных белков. Важно подчеркнуть, что функции части этих белков неизвестны и они потенциально могут иметь отношение к необычному патогенезу COVID-19.

Реалии и перспективы разработки лекарств, специфичных для SARS-CoV-2

На основании опыта последних десятилетий известно, что идеальным и специфичным лекарством против конкретного вируса может быть ингибитор критической для жизненного цикла вируса ферментативной активности (например, его репликации) или структурного взаимодействия с участием вирусных белков (например, при взаимодействии вируса с клеточными рецепторами или при слиянии вирусной липидной оболочки с плазматической или лизосомальной мембраной).

Для всех РНК-содержащих вирусов самой привлекательной терапевтической мишенью является РНК-зависимая РНК-полимераза — фермент, который отсутствует в клетках человека и животных. Для ретровирусов, интегрирующих

свой геном в геном хозяина (таких как ВИЧ-1), соответствующим ферментом-мишенью является обратная транскриптаза. В обоих случаях эффективными ингибиторами матричного синтеза, катализируемого этими ферментами, являются аналоги нуклеозидов или их предшественники (нуклеозиды, в отличие от нуклеотидов, способны проникать через клеточную мембрану). Присутствие в клетке хозяина таких аналогов субстратов во время репликации РНК приводит к преждевременному обрыву нуклеотидной цепи и эффективной блокировке репликации или обратной транскрипции вирусной РНК. Не случайно существующие ингибиторы для репликации вирусов гепатитов В и С, вирусов Эбола, Марбурга и ВИЧ после начала пандемии COVID-19 были немедленно исследованы и на предмет блокирования SARS-CoV-2 (табл. 1).

В настоящий момент наиболее перспективными считаются препараты ремдесивир (первоначально разрабатываемый для терапии ВИЧ, но реально показавший эффективность и одобренный для лечения вирусных гепатитов) и фавипи-

равир (первоначально разработанный для терапии гриппа).

Кроме того, проводятся систематические исследования обширных коллекций других нуклеозидных препаратов на предмет блокирования репликации SARS-CoV-2. И с помощью различных схем скрининга и компьютерного моделирования проводится поиск различных малых молекул, которые могли бы показать наибольшую эффективность в ингибировании РНК-зависимой РНК-полимеразы, конкретно SARS-CoV-2. С большой вероятностью можно предполагать, что в течение полугода начнутся доклинические и клинические испытания новых прототипов лекарственных препаратов, полученных в ходе подобных высокотехнологичных изысканий. Будем надеяться, что в 2021 г. некоторые из них придут в клинику.

Почти все вышесказанное справедливо и для поиска другого класса противовирусных препаратов – ингибиторов вирусной протеазы, без которой он не сможет правильно «нарезать» некоторые свои белки (например, белки репликазного комплекса) и завершать свой жизнен-

ТАБЛИЦА 1. ИНГИБИТОРЫ РНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ, ПОТЕНЦИАЛЬНО ОБЛАДАЮЩИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ПРОТИВ SARS-CoV-2

TABLE 1. INHIBITORS OF RNA-DEPENDENT RNA-POLYMERASE WITH POTENTIAL THERAPEUTIC EFFECTS AGAINST SARS-CoV-2

Название вещества Drug name	Нуклеозид Nucleoside	Первоначальная терапия Primary therapy	Предпосылки к клиническим исследованиям Reference	Клинические исследования Clinical trials
Ремдесивир Remdesivir	Аналоги аденозина Adenosine analogue	Гепатит С Hepatitis C	[15, 34]	NCT04365725
Галидесивир Galidesivir		Гепатит С, вирус Эбола, вирус Марбурга Hepatitis C, Ebola virus, Marburg virus	[12, 38]	NCT03891420
Тенофовир Tenofovir		Гепатит В Hepatitis B	[12]	NCT04334928
Рибавирин Ribavirin	Аналог гуанозина Guanosine analogue	Респираторный синцитиальный вирус человека, гепатит В, вирусы геморрагических лихорадок Respiratory Syncytial Virus, Hepatitis B, viral hemorrhagic fevers	[12, 18]	NCT04334928
Фавипиравир/ арепливир/ авифавир Favipiravir/Avigan/ Abigan	Аналоги пуриновых оснований Purine analogue	Вирус гриппа Influenza virus	[11]	NCT04402203 NCT04310228

ТАБЛИЦА 2. БЛОКАТОРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА С КЛЕТКОЙ-МИШЕНЬЮ

TABLE 2. INHIBITORS OF VIRUS AND TARGET CELL INTERACTION

Название лекарства Drug type or name	Механизм действия Mechanism of action	Предпосылки к клиническим исследованиям Reference	Клинические исследования Clinical trial
Блокаторы рецептора ангиотензина Angiotensin receptor blockers	Ингибирование рецептора ангиотензина Inhibition of angiotensin receptor	[22, 23]	NCT04394117 NCT04355936
Ангиотензин II Angiotensin II	Связывание с S-белком SARS-CoV-2 Interaction/binding to S-protein of SARS-COV-2	[32]	NCT04408326
Озелтамивир и балоксавир Oseltamivir and baloxavir	Ингибирование вируса гриппа Influenza's neuraminidase inhibitors	[30]	NCT04255017

ный цикл. В настоящий момент в испытаниях находятся ингибиторы протеаз, разработанные первоначально для других вирусов (Данопревир [35], Лопинавир/ритонавир [7], Камостат мезилат [31]), а параллельно ведется поиск веществ, которые были максимально специфичны для протеазы SARS-CoV-2. Предположительно, применение коктейля ингибиторов ключевых ферментов SARS-CoV-2 – РНК-полимеразы и протеазы (возможно, к ним добавятся и другие ферменты репликазного комплекса, например хеликазы) станет наиболее эффективным профилактическим и терапевтическим средством, как это произошло для блокирования ВИЧ-1.

Следующим классом веществ, которые могли бы показать высокую эффективность при лечении COVID-19, являются ингибиторы различных стадий сложного процесса входа вируса в клетку. Ведутся разработки молекул, которые будут препятствовать взаимодействию «шипа» вириона с клеточными рецепторами (главным из которых, известных на сегодняшний день, является заякоренная на мембране клетки протеаза – «ангиотензин-конвертирующий фермент», ACE-2), молекул, препятствующих слиянию мембраны клетки и вирусной оболочки и т.д. Несколько кандидатных веществ этого класса уже вошли в клинические испытания и представлены в таблице 2.

И, наконец, еще один класс возможных терапевтических веществ – ингибиторы действия тех белков вируса, которые не относятся к структурным белкам вириона и не являются частью

ферментативных функциональных комплексов, обсуждавшихся выше. Можно ожидать, что некоторые из этих белков вносят вклад в немедленные или, наоборот, отложенные аспекты патогенеза COVID-19, как это имеет место быть при ВИЧ-инфекции (примером такого белка может служить Nef). Пока это область чисто фундаментальных исследований, но современные технологии позволяют найти ингибиторы функции или взаимодействия практически для любого белка.

Нейтрализующие SARS-CoV-2 антитела как лекарства

Успехи в применении плазмы крови переболевших для терапии COVID-19 подтвердили образование нейтрализующих IgG антител у значительной части выздоровевших пациентов [21]. Современные технологии позволяют выделить из такой плазмы антитела, а из лимфоцитов переболевших – перестроенные гены антител для последующего получения рекомбинантных нейтрализующих моноклональных антител [14, 25]. Такие антитела принципиально не отличаются от широко распространенных лекарственных средств на основе терапевтических антител и могут применяться как для профилактики, так и для терапии COVID-19. Следует подчеркнуть, что применение таких защитных антител не эквивалентно вакцинации, так как у пациента не образуется специфических лимфоцитов (в том числе клеток памяти) и плазматических клеток, а время жизни в организме даже у оптимизированных с помощью биоинженерии антител ограничено. Кроме того, стоимость таких лекарств

ТАБЛИЦА 3. ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ЦИТОКИНОВЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ И ИНТЕРФЕРОНОВЫЕ ПУТИ

TABLE 3. MODULATION OF CYTOKINE AND INTERFERON SIGNALING CASCADES

Название лекарства Drug name	Механизм действия Mechanism of action	Предпосылки к клиническим исследованиям Reference	Клинические исследования Clinical trials
Тоцилизумаб Tocilizumab	Блокаторы рецептора IL-6 Inhibition of IL-6 receptor	[36]	NCT04317092 NCT04363853 NCT04335071 NCT04320615 NCT04331795 NCT04315480 NCT04310228 NCT04332913 NCT04330638 NCT04306705 ChiCTR2000029765
Сарилумаб Sarilumab		[9, 10]	NCT04315298 NCT04327388 NCT04341870
Силтуксимаб Siltuximab	Блокаторы IL-6 IL-6 inhibitors	[10]	NCT04329650 NCT04330638
Олокицумаб Olokizumab		Данные отсутствуют Not available	NCT04380519
Анакинра Anakinra	Антагонист рецептора IL-1 IL-1 antagonists	[2, 10]	NCT04366232 NCT04330638
Канакинумаб Canakinumab	Блокатор IL-1 IL-1 inhibitors	[10]	NCT04362813
Эмапалумаб Emapalumab	Блокатор интерферона-гамма Interferon-gamma inhibitor	Данные отсутствуют Not available	NCT04324021
Интерфероны 1 типа Type I Interferons	Противовирусные агенты Anti-viral agents	[24]	NCT04293887
Адалимумаб Adalimumab	Блокатор TNF TNF inhibitor	[13]	ChiCTR2000030089

будет весьма значительной. Предполагается, что рекомбинантные нейтрализующие антитела будут использоваться, в первую очередь, для защиты медицинского персонала и пациентов из групп риска.

Антитела, связавшиеся с вирусом, потенциально могут способствовать его попаданию в клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (в первую очередь, миелоидные клетки). Это свойство иногда рассматривается как потенциальное препятствие как для вакцинаций, так и для использования терапевтических антител [26, 27]. Однако, не отрицая такой теоретической возможности, следует подчеркнуть безусловную эффективность многих противовирусных вакцин (например, из российского календаря прививок), главный механизм действия которых – защитные антитела. Правильно проведенные доклинические испытания способны и обязаны выявить эти нежела-

тельные побочные эффекты вакцинных препаратов или конкретных терапевтических антител.

Интерфероны 1 типа

В геноме человека и животных закодирована противовирусная программа, которая в случае своей активации препятствует размножению вируса либо за счет расщепления вирусной РНК специальной РНКазой, либо вследствие интерференции с процессом трансляции, тем самым замедляя или предотвращая синтез вирусных белков. Эта программа активируется интерферонами 1-го типа, альфа и бета (но не гамма, хотя в нашей стране рекомбинантный интерферон-гамма пропагандируется как противовирусное лекарство), синтез которых следует за иммунным распознаванием вируса, в том числе вирусной РНК, после попадания вируса внутрь клетки и его раздевания. Зараженная клетка, внутри которой произошло такое распознавание, отвечает

синтезом интерферонов 1-го типа (и других цитокинов), которые секретируются и действуют на все клетки (как правило, проксимально), на которых имеются высокоаффинные рецепторы к этим интерферонам. В результате происходит запуск сигнального каскада, который активирует эффекторные защитные молекулы. Многие вирусы, в частности бета-коронавирусы, к которым относится SARS-CoV-2, умеют по крайней мере частично уклоняться от иммунного распознавания. Так, одним из молекулярных механизмов вирусной эвазии является «кэпирование» 5'-конца вирусной РНК, что делает ее похожей на мРНК хозяина [20]. В результате вирусная РНК не распознается и не происходит активации синтеза эндогенных интерферонов 1-го типа. По-видимому, SARS-CoV-2 использует и другие механизмы эвазии.

Рекомбинантные интерфероны 1-го типа давно стали успешными лекарствами и показали свою эффективность против многих вирусных инфекций, в частности ОРВИ. Казалось бы, фармакологическое применение интерферонов позволяет обойти неэффективное иммунное распознавание и недостаток в эндогенном интерфероне. Однако для успешной блокировки вируса молекулы интерферонов 1-го типа должны

оказаться в нужное время рядом с зараженными клетками, несущими рецепторы интерферонов, и в достаточной концентрации. На собранные вирусные частицы и на сам процесс заражения интерфероны не действуют. По данным существующей литературы, применение интерферонов 1-го типа против COVID-19 либо неэффективно, либо малоэффективно. Это может объясняться особенностями клеток-мишеней для вируса, которые в свою очередь, определяются уровнем экспрессии рецепторов для входа вируса, таких как ACE-2, или какими-то пока не установленными механизмами противодействия со стороны SARS-CoV-2. Тем не менее нельзя исключить, что интерфероны 1-го типа все же войдут в будущие протоколы профилактики и терапии, наряду со специфическими блокаторами, которые обсуждались выше.

Препараты неспецифического действия

Блокаторы воспаления и «цитокинового шторма»

У многих зараженных патогенез COVID-19 сопровождается острой воспалительной реакцией и иммунопатологиями, связанными с избыточной продукцией провоспалительных молекул. К таким белкам относятся классические провоспалительные цитокины – интерлейкин 1

ТАБЛИЦА 4. ИНГИБИТОРЫ МОЛЕКУЛ, ОТВЕЧАЮЩИХ ЗА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КАСКАДЫ В КЛЕТКАХ ХОЗЯИНА

TABLE 4. INHIBITORS OF CELL PROLIFERATION AND INTRACELLULAR SIGNALING CASCADES

Название лекарства Drug name	Механизм действия Mechanism of action	Предпосылки к клиническим исследованиям References	Клинические исследования Clinical trials
Иматиниб Imatinib	Ингибитор протеинтирозинкиназы (Bcr-Abl тирозинкиназы) Protein kinase inhibitor (Bcr-Abl tyrosine kinase)	[5]	NCT04394416
Барicitиниб Baricitinib	Ингибиторы Janus kinases (JAK1/2) Janus kinase inhibitors (JAK1/2)	[6]	NCT04358614
Руксолитиниб Ruxolitinib		[8]	NCT04348071
Маврилимуаб Mavrilimumab	Ингибитор рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека GM-CSF-R Inhibitor of human granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor (GM-CSF-R)	Данные отсутствуют Not available	NCT04399980
Бевацизумаб Bevacizumab	Антитела, ингибирующие биологическую активность фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) Circulating vascular endothelial-derived growth factor (VEGF)		NCT04275414

(IL-1), интерлейкин 6 (IL-6) [37] и фактор некроза опухоли (TNF), а также некоторые хемокины (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CXCL1/KC). Их аномально высокая системная концентрация, которая может приводить к тяжелым последствиям и даже смерти, называется «цитокиновым штормом».

При различных острых воспалительных заболеваниях у пациентов может наблюдаться разное соотношение концентраций «штормящих» цитокинов, но при COVID-19 наибольшее внимание привлечено IL-6, высокая системная продукция которого коррелирует с тяжелым течением болезни. Поскольку анти-цитокиновая терапия давно применяется для лечения целого ряда аутоиммунных заболеваний, то у клиницистов имеется значительный арсенал лекарств для предотвращения развития цитокинового шторма (табл. 3). Сейчас наиболее часто применяемым лекарством, показавшим свою эффективность при лечении COVID, является тоцилизумаб — антагонист рецептора IL-6. Аналогичный препарат российского производства называется левилимаб. Следует отметить, что взаимная регуляция экспрессии цитокинов и образуемые ими «цитокиновые сети» во многих случаях позволяют при блокировке одного-единственного цитокина успешно успокоить весь цитокиновый шторм. Причина, по которой пока с высокой долей осторожности применяются блокаторы TNF, — опасения о возможности реактивировать бактериальные инфекции (например туберкулез, пневмококковая пневмония, менингит, листериоз, сальмонеллез, болезнь Легионеров и др.) Тем не менее можно предположить, что кратковременное применение блокаторов TNF найдет свое место в будущих терапевтических протоколах.

Блокировка продукции цитокинов возможна и за счет интерференции с внутриклеточными сигнальными каскадами, ведущими к активации их биосинтеза (например сигнальных белок-киназ). Хотя некоторые из существующих лекарств этого класса испытываются и против COVID-19 (табл. 4), от этих препаратов следует ожидать больше побочных эффектов, так как блокируемые ими сигнальные каскады обслуживают значительное число молекулярно-клеточных механизмов защиты и гомеостаза.

Кроме того, еще один возможный подход к подавлению чрезмерного системного воспаления при COVID-19 может заключаться в применении неспецифических как стероидных, так и нестероидных противовоспалительных препаратов, причем, согласно предварительным данным, дексаметазон показал эффективность для пациентов с тяжелой формой COVID-19 [17], а эффективность некоторых нестероидных пре-

паратов была ранее показана в отношении SARS-CoV. В настоящий момент проводятся клинические исследования, направленные на оценку эффективности как стероидных, так и нестероидных противовоспалительных препаратов (NCT04344730, NCT04325633, NCT04344457). Можно ожидать, что какие-то из них войдут в терапевтические протоколы для пациентов с COVID-19. Возможно, они будут показаны не всем больным.

Антикоагулянтная терапия

Один из характерных симптомов COVID-19, связанный с тяжелым течением болезни и неблагоприятным прогнозом, выражается в развитии коагулопатии. В отсутствие результатов полномасштабных клинических исследований, Международное общество специалистов по тромбозу и гемостазу (ISTH) выпустило временные рекомендации по выявлению и коррекции коагулопатии у пациентов с COVID-19 [29]. Ухудшение таких клинических показателей или маркеров гемостаза, как уровень Д-димера, протромбиновое время, количество тромбоцитов и уровень фибриногена, свидетельствуют о нарастающей коагулопатии. По этой причине всем госпитализируемым пациентам с COVID-19 рекомендуется применение низкомолекулярного гепарина в профилактической дозе при отсутствии противопоказаний (активное кровотечение, низкий уровень тромбоцитов и некоторые др.). Однако некоторые пациенты характеризуются устойчивостью к гепарину и не отвечают на его профилактическое введение, что, предположительно, связано с низкой продукцией анти-тромбина и высоким уровнем фибриногена у таких больных [4], что требует дальнейшего изучения и рассмотрения возможности терапевтического введения нефракционированного гепарина для предотвращения тромбоэмболии. С долей осторожности обсуждается и возможное назначение антикоагулянтов перорально внебольничным пациентам с легкой формой течения COVID-19 [16, 28]. Наконец, предложено и некоторое количество экспериментальных подходов к лечению COVID-19, включая введение антитромбина или рекомбинантного тромбомодулина, а также возможное применение японского препарата нафамостата (Nafamostat), ингибитора сериновых протеаз, который блокирует протеолитическую активность таких белков как тромбин, плазмин и трипсин [33].

Противомалярийные препараты

Особняком стоит группа противомалярийных препаратов: гидроксихлорохина, хлорохина и мефлохина. Эффективность их применения при лечении COVID-19 по последним данным представляется сомнительной [19]. В этой связи FDA

ввело ограничение на использование гидроксихлорохина и хлорохина при лечении COVID-19 в связи с риском развития нежелательных побочных эффектов.

Заключение

Поскольку распространение вируса SARS-CoV-2 и эпидемию COVID-19 долгое время не удавалось остановить, появились теории, что этот вирус – особый и его не удастся победить. Отметим, что, хотя механизмы патогенеза SARS-CoV-2 еще не до конца поняты, пока в этом вирусе и в его стратегии не найдено никакой принципиально новой парадигмы, которая могла бы поставить под сомнение возможность создания специфических лекарств и профилактических

вакцин. Можно предположить, что лечение больных COVID-19 будет комплексным и протоколы будут различаться для разных групп пациентов. В этой связи, огромное значение приобретают биомаркеры, которые могли бы правильно стратифицировать инфицированных и назначать им оптимальный протокол лечения. Полная победа над пандемией COVID-19 возможна только при разработке эффективных профилактических вакцин.

Благодарности

Авторы благодарны А.П. Топтыгиной и С.Н. Кочеткову за комментарии и ценное обсуждение.

Список литературы / References

1. Львов Д.К., Альховский С.В. Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика коронавирусов (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод Sarbecovirus), MERS-CoV (подрод Merbecovirus) // Вопросы вирусологии, 2020. Т. 65, № 2. С. 62-70. [Lvov D.K., Alkhovskiy S.V. Source of the COVID-19 pandemic: ecology and genetics of coronaviruses (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus Sarbecovirus), and MERS-CoV (subgenus Merbecovirus). *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2020, Vol. 65, no. 2, pp. 62-70. (In Russ.)]
2. Aouba A., Baldolli A., Geffray L., Verdon R., Bergot E., Martin-Silva N., Justet A. Targeting the inflammatory cascade with anakinra in moderate to severe COVID-19 pneumonia: case series. *Ann. Rheum. Dis.*, 2020, Vol. 79, no. 10, pp. 1381-1382.
3. Asakura H., Ogawa H. Potential of heparin and nafamostat combination therapy for COVID-19. *J. Thromb. Haemost.*, 2020, Vol. 18, no. 6, pp. 1521-1522.
4. Barrett C.D., Moore H.B., Yaffe M.B., Moore E.E. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19: a comment. *J. Thromb. Haemost.*, 2020, Vol. 18, no. 8, pp. 2060-2063.
5. Bernal-Bello D., Jaenes-Barríos B., Morales-Ortega A., Ruiz-Giardin J.M., García-Bermúdez V., Frutos-Pérez B., Farfán-Sedano A.I., de Ancos-Aracil C., Bermejo F., García-Gil M., Zapatero-Gaviria A., San Martín-López J.V. Imatinib might constitute a treatment option for lung involvement in COVID-19. *Autoimmun. Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 7, 102565. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102565.
6. Cantini F., Niccoli L., Nannini C., Matarrese D., Di Natale M.E., Lotti P., Aquilini D., Landini G., Cimolato B., Di Pietro M.A., Trezzi M., Stobbione P., Frausini G., Navarra A., Nicastrì E., Sotgiu G., Goletti D. Retrospective, multicenter study on the impact of baricitinib in COVID-19 moderate pneumonia. *J. Infect.*, 2020. doi: 10.1016/j.jinf.2020.06.052.
7. Cao B., Wang Y., Wen D., Liu W., Wang J., Fan G., Ruan L., Song B., Cai Y., Wei M., Li X., Xia J., Chen N., Xiang J., Yu T., Bai T., Xie X., Zhang L., Li C., Yuan Y., Chen H., Li H., Huang H., Tu S., Gong F., Liu Y., Wei Y., Dong C., Zhou F., Gu X., Xu J., Liu Z., Zhang Y., Li H., Shang L., Wang K., Li K., Zhou X., Dong X., Qu Z., Lu S., Hu X., Ruan S., Luo S., Wu J., Peng L., Cheng F., Pan L., Zou J., Jia C., Wang J., Liu X., Wang S., Wu X., Ge Q., He J., Zhan H., Qiu F., Guo L., Huang C., Jia T., Hayden F.G., Horby P.W., Zhang D., Wang C. A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe covid-19. *New Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, no. 19, pp. 1787-1799.
8. Cao Y., Wei J., Zou L., Jiang T., Wang G., Chen L., Huang L., Meng F., Huang L., Wang N., Zhou X., Luo H., Mao Z., Chen X., Xie J., Liu J., Cheng H., Zhao J., Huang G., Wang W., Zhou J. Ruxolitinib in treatment of severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): a multicenter, single-blind, randomized controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 146, no. 1, pp. 137-146.e3
9. Chakraborty C., Sharma A.R., Bhattacharya M., Sharma G., Lee S., Agoramoorthy G. COVID-19: consider IL-6 receptor antagonist for the therapy of cytokine storm syndrome in SARS-CoV-2 infected patients. *J. Med. Virol.*, 2020. doi: 10.1002/jmv.26078.
10. Curtin N., Bányaí K., Thaventhiran J., le Quesne J., Helyes Z., Bai P. Repositioning PARP inhibitors for SARS-CoV-2 infection (COVID-19); a new multi-pronged therapy for ARDS? *Br. J. Pharmacol.*, 2020, Vol. 177, no. 16, pp. 3635-3645.
11. Du Y.X., Chen X.P. Favipiravir: pharmacokinetics and concerns about clinical trials for 2019-nCoV infection. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2020, Vol. 108, no. 2, pp. 242-247.

12. Elfiky A.A. Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): a molecular docking study. *Life Sci.*, 2020, Vol. 253, 117592. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117592.
13. Feldmann M., Maini R.N., Woody J.N., Holgate S.T., Winter G., Rowland M., Richards D., Hussell T. Trials of anti-tumour necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10234, pp. 1407-1409.
14. Goldstein L.D., Chen Y.J.J., Wu J., Chaudhuri S., Hsiao Y.C., Schneider K., Hoi K.H., Lin Z., Guerrero S., Jaiswal B.S., Stinson J., Antony A., Pahuja K.B., Seshasayee D., Modrusan Z., Hötzel I., Seshagiri S. Massively parallel single-cell B-cell receptor sequencing enables rapid discovery of diverse antigen-reactive antibodies. *Commun. Biol.*, 2019, Vol. 2, 304. doi: 10.1038/s42003-019-0551-y.
15. Gordon C.J., Tchesnokov E.P., Feng J.Y., Porter D.P., Götte M. The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Biol. Chem.*, 2020, Vol. 295, no. 15, pp. 4773-4779.
16. Hermans C., Lambert C. Impact of the COVID-19 pandemic on therapeutic choices in Thrombosis-Hemostasis. *J. Thromb. Haemost.*, 2020, Vol. 18, no. 7, pp. 1794-1795.
17. Horby P., Lim W.S., Emberson J., Mafham M., Bell J., Linsell L., Staplin N., Brightling C., Ustianowski A., Elmahi E., Prudon B., Green C., Felton T., Chadwick D., Rege K., Fegan C., Chappell L.C., Faust S.N., Jaki T., Jeffery K., Montgomery A., Rowan K., Juszczak E., Baillie J.K., Haynes R., Landray M.J., Group R.C. Effect of Dexamethasone in hospitalized patients with COVID-19: preliminary report. *N. Engl. J. Med.*, 2020. doi: 10.1056/NEJMoa2021436.
18. Khalili J.S., Zhu H., Mak N.S.A., Yan Y., Zhu Y. Novel coronavirus treatment with ribavirin: groundwork for an evaluation concerning COVID-19. *J. Med. Virol.*, 2020, Vol. 92, no. 7, pp. 740-746.
19. Meyerowitz E.A., Vannier A.G.L., Friesen M.G.N., Schoenfeld S., Gelfand J.A., Callahan M.V., Kim A.Y., Reeves P.M., Poznansky M.C. Rethinking the role of hydroxychloroquine in the treatment of COVID-19. *FASEB J.*, 2020, Vol. 34, no. 5, pp. 6027-6037.
20. Ramanathan A., Robb G.B., Chan S.H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.*, 2016, Vol. 44, no. 16, pp. 7511-7526.
21. Rojas M., Rodríguez Y., Monsalve D.M., Acosta-Ampudia Y., Camacho B., Gallo J.E., Rojas-Villarraga A., Ramírez-Santana C., Díaz-Coronado J.C., Manrique R., Mantilla R.D., Shoenfeld Y., Anaya J.M. Convalescent plasma in Covid-19: possible mechanisms of action. *Autoimmun. Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 7, 102554. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102554.
22. Rothlin R.P., Vetulli H.M., Duarte M., Pelorosso F.G. Telmisartan as tentative angiotensin receptor blocker therapeutic for COVID-19. *Drug Dev. Res.*, 2020. doi: 10.1002/ddr.21679.
23. Saavedra J.M. Angiotensin receptor blockers and COVID-19. *Pharmacol. Res.*, 2020, Vol. 156, 104832. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104832.
24. Sallard E., Lescure F.X., Yazdanpanah Y., Mentre F., Peiffer-Smadja N. Type 1 interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral Res.*, 2020, Vol. 178, 104791. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104791.
25. Setliff I., Shiakolas A.R., Pilewski K.A., Murji A.A., Mapengo R.E., Janowska K., Richardson S., Oosthuysen C., Raju N., Ronsard L., Kanekiyo M., Qin J.S., Kramer K.J., Greenplate A.R., McDonnell W.J., Graham B.S., Connors M., Lingwood D., Acharya P., Morris L., Georgiev I.S. High-throughput mapping of B cell receptor sequences to antigen specificity. *Cell*, 2019, Vol. 179, no. 7, pp. 1636-1646.e15.
26. Takeda A., Tuazon C.U., Ennis F.A. Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor-mediated entry. *Science*, 1988, Vol. 242, no. 4878, pp. 580-583.
27. Tamura M., Webster R.G., Ennis F.A. Antibodies to HA and NA augment uptake of influenza A viruses into cells via Fc receptor entry. *Virology*, 1991, Vol. 182, no. 1, pp. 211-219.
28. Testa S., Paoletti O., Giorgi-Pierfranceschi M., Pan A. Switch from oral anticoagulants to parenteral heparin in SARS-CoV-2 hospitalized patients. *Intern. Emerg. Med.*, 2020, pp. 1-3. doi: 10.1007/s11739-020-02331-1.
29. Thachil J., Tang N., Gando S., Falanga A., Cattaneo M., Levi M., Clark C., Iba T. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J. Thromb. Haemost.*, 2020, Vol. 18, no. 5, pp. 1023-1026.
30. Tomasoni D., Italia L., Adamo M., Inciardi R.M., Lombardi C.M., Solomon S.D., Metra M. COVID-19 and heart failure: from infection to inflammation and angiotensin II stimulation. Searching for evidence from a new disease. *Eur. J. Heart Fail.*, 2020, Vol. 22, no. 6, pp. 957-966.
31. Uno Y. Camostat mesilate therapy for COVID-19. *Intern. Emerg. Med.*, 2020, pp. 1-2. doi: 10.1007/s11739-020-02345-9.
32. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J., Wang B., Xiang H., Cheng Z., Xiong Y., Zhao Y., Li Y., Wang X., Peng Z. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel Coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 2020, Vol. 323, no. 11, pp. 1061-1069.
33. Yamamoto M., Matsuyama S., Li X., Takeda M., Kawaguchi Y., Inoue J.I., Matsuda Z. Identification of nafamostat as a potent inhibitor of middle east respiratory syndrome Coronavirus s protein-mediated membrane fusion using the split-protein-based cell-cell fusion assay. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, Vol. 60, no. 11, pp. 6532-6539.
34. Yin W., Mao C., Luan X., Shen D.-D., Shen Q., Su H., Wang X., Zhou F., Zhao W., Gao M., Chang S., Xie Y.-C., Tian G., Jiang H.-W., Tao S.-C., Shen J., Jiang Y., Jiang H., Xu Y., Zhang S., Zhang Y., Xu H.E. Structural

basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science*, 2020, Vol. 368, no. 6498, pp. 1499-1504.

35. Zhang Z., Wang S., Tu X., Peng X., Huang Y., Wang L., Ju W., Rao J., Li X., Zhu D., Sun H., Chen H. A comparative study on the time to achieve negative nucleic acid testing and hospital stays between danoprevir and lopinavir/ritonavir in the treatment of patients with COVID-19. *J. Med. Virol.*, 2020. doi: 10.1002/jmv.26141.

36. Zhang C., Wu Z., Li J.W., Zhao H., Wang G.Q. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2020, Vol. 55, no. 5, 105954. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105954.

37. Zhang J.M., An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.*, 2007, Vol. 45, no. 2, pp. 27-37.

38. Zhang W.F., Stephen P., Thériault J.F., Wang R., Lin S.X. Novel Coronavirus polymerase and nucleotidyltransferase structures: potential to target new outbreaks. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2020, Vol. 11, no. 11, pp. 4430-4435.

Авторы:

Бозрова С.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Друцкая М.С. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Недоспасов С.А. — д.б.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук; заведующий кафедрой иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва; научный руководитель направления «Иммунология и биомедицина», Научно-технологический университет «Сириус», г. Сочи, Россия

Authors:

Bozrova S.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Drutskaya M.S., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Nedospasov S.A., PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Head, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow; Head of the Section "Immunobiology and Biomedicine", Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russian Federation

Поступила 01.06.2020
Принята к печати 01.07.2020

Received 01.06.2020
Accepted 01.07.2020

ПОДДЕРЖАНИЕ CD4⁺ ЦЕНТРАЛЬНЫХ И ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК ПАМЯТИ В НОРМЕ И В МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ *IN VITRO*

Блинова Е.А.¹, Колерова А.В.¹, Балясников В.Е.², Козлов В.А.¹

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

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. В организме ключевым фактором для выживания и поддержания CD4⁺ центральных (Тсм) и эффекторных (Тем) клеток памяти является ИЛ-7. При многих аутоиммунных заболеваниях детектируется повышенный уровень ИЛ-7 в сыворотке крови, очаге воспаления, что ставит вопрос об участии данного гомеостатического фактора в выживании Т-клеток памяти, в том числе аутореактивных, в условиях воспаления.

Целью исследования явилось изучение механизмов поддержания CD4⁺Т-клеток памяти в норме и в условиях воспаления. Мы разработали модель воспаления *in vitro*, основанную на индукции провоспалительных цитокинов, и оценили влияние ИЛ-7 на сортированные популяции CD4⁺Тсм и Тем в норме и в модели воспаления *in vitro*. ИЛ-7 способствовал сохранению CD4⁺Тсм во всех вариантах культур. В отсутствие контакта с прилипающей фракцией пролиферативный ответ Тсм и Тем на ИЛ-7 был немного снижен как в норме, так и в условиях воспаления. Что говорит о меньшей чувствительности Т-клеток памяти к контактам с МНС и, возможно, необходимости в дополнительных сигналах для полноценной стимуляции ИЛ-7. В пользу данного утверждения свидетельствуют и данные об экспрессии CD127 и CD132: в отсутствие контакта с МНС доля CD127⁺CD132⁺ клеток уменьшалась в обеих субпопуляциях CD4⁺ клеток памяти. В культурах *in vitro* ИЛ-7 способствовал снижению экспрессии CD127 и увеличению экспрессии CD132 на CD4⁺Тсм и Тем.

Мы охарактеризовали CD4⁺Тсм и Тем по аффинности Т-клеточного рецептора (ТКР), используя уровень экспрессии CD5. Известно, что клетки с высокой аффинностью ТКР к собственным антигенам обладают более высокой экспрессией CD5. Тсм содержали большее количество CD5^{high} клеток по сравнению с Тем. В культурах ИЛ-7 способствовал поддержанию высокого уровня экспрессии CD5 на Тсм, который был сопоставим с уровнем экспрессии в периферической крови. Высокая экспрессия CD5 на Тем наблюдалась при добавлении ИЛ-7 в модели воспаления *in vitro*. В отсутствие контакта с МНС число CD5^{high} среди CD4⁺Тсм и Тем снижалось.

Таким образом, CD4⁺Тсм клетки с высоким родством к аутологичным антигенам, возможно, зависимы от наличия гомеостатических факторов, в частности ИЛ-7, и контакта с антигенпрезентирующими клетками (АПК). В условиях воспаления не было выявлено изменений в механизме поддержания CD4⁺Тсм, в отличие от CD4⁺Тем. Менее зависимые от ИЛ-7 в обычных условиях, CD4⁺CD5^{high}Тем клетки накапливались в условиях воспаления в присутствии ИЛ-7.

Ключевые слова: центральные Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки памяти, ИЛ-7, рецептор для ИЛ-7, CD5, провоспалительные цитокины, модель воспаления *in vitro*

Адрес для переписки:

Блинова Елена Андреевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и фундаментальной иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: blinovaelena-85@yandex.ru

Address for correspondence:

Blinova Elena A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 227-01-35.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: blinovaelena-85@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.А. Блинова, А.В. Колерова, В.Е. Балясников, В.А. Козлов «Поддержание CD4⁺ центральных и эффекторных клеток памяти в норме и в модели воспаления *in vitro*» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 837-846.
doi: 10.15789/1563-0625-IVM-1975
© Блинова Е.А. и соавт., 2020

For citation:

E.A. Blinova, A.V. Kolerova, V.E. Kolerova, V.A. Kozlov "In vitro maintaining of CD4⁺ central and effector memory cells in normal and inflammatory conditions", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 837-846.
doi: 10.15789/1563-0625-IVM-1975
DOI: 10.15789/1563-0625-IVM-1975

IN VITRO MAINTAINING OF CD4⁺ CENTRAL AND EFFECTOR MEMORY CELLS IN NORMAL AND INFLAMMATORY CONDITIONS

Blinova E.A.^a, Kolerova A.V.^a, Kolerova A.V.^b, Kozlov V.A.^a

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

^b Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. IL-7 is a key factor for the survival and maintenance of CD4⁺ central (Tcm) and effector (Tem) memory cells in the whole body. In many autoimmune diseases, an elevated level of IL-7 is detected in blood serum and at the site of inflammation, thus suggesting participation of this homeostatic factor in the survival of memory T cells, including auto-reactive clones, in inflammatory disorders. The aim of the study was to investigate the mechanisms of maintaining CD4⁺ memory T cells under normal and inflammatory conditions. We developed an *in vitro* model of inflammation, based on induction of pro-inflammatory cytokines, and then evaluated the effects of IL-7 upon purified sorted populations of CD4⁺Tcm and Tem under normal conditions and *in vitro* inflammatory model. IL-7 treatment promoted maintenance of CD4⁺Tcm phenotype in all variants of cultures. In the absence of contact with adherent cell fraction, the IL-7-induced proliferation of Tcm and Tem was slightly reduced, both under normal and inflammatory conditions, thus suggesting low sensitivity of memory T cells to contacts with MHC, and, probably, a requirement for additional signals to provide complete stimulation with IL-7. The last suggestion is also supported by data about CD127 and CD132 expression, i.e., in the absence of contact with MHC, the proportion of CD127⁺CD132⁺ cells was decreased in both subpopulations of CD4⁺ memory cells. Upon *in vitro* cultures, IL-7 contributed to decreased expression of CD127, and increased expression of CD132 on CD4⁺Tcm and Tem.

We have evaluated the CD4⁺Tcm and Tem populations by affinity of T cell receptor (TCR), using the level of CD5 expression. T cells with high TCR affinity for self-antigens are known to have higher expression of CD5. In comparison to Tem, the Tcm contained more CD5^{high} cells. In cultures, IL-7 promoted a high level of CD5 expression on Tcm, which was comparable to levels observed in peripheral blood cells. High CD5 expression on Tem was observed after stimulation with IL-7 in the *in vitro* inflammatory model. In the absence of contact with MHC, the number of CD5^{high} cells decreased among CD4⁺Tem and Tcm.

Thus, CD4⁺Tcm cells with high affinity for autologous antigens are probably dependent on the presence of homeostatic factors, in particular, IL-7, and contacts with antigen-presenting cells (APCs). Under conditions of inflammation, no changes were revealed in the mechanism of maintaining CD4⁺Tcm, in contrast to CD4⁺Tem. Being less dependent on IL-7 under normal conditions, CD4⁺CD5^{high}Tem are accumulated in the presence of IL-7 under *in vitro* inflammatory conditions.

Keywords: central memory T cells, effector memory T cells, IL-7, IL-7 receptor, CD5, proinflammatory cytokines, inflammation model *in vitro*

Данная работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект РНФ № 18-75-00068).

Введение

Образование Т-клеток памяти происходит в ответ на антигенную стимуляцию во вторичных лимфоидных органах. В результате клетки приобретают способность мигрировать в органы и ткани организма, продуцировать спектр цитокинов, осуществляя эффекторную функцию напрямую или опосредовано, через активацию клеток врожденного иммунного ответа. Большая часть эффекторных Т-клеток при этом гибнет, а циркулирующие долгоживущие Т-клетки памяти формируют иммунологическую память. На сегодняшний день Т-клетки памяти представляют гетерогенную популяцию. В зависимости от экс-

прессии поверхностных маркеров Т-клетки памяти принято разделять на [9]:

– центральные (CD45RO⁺CCR7⁺CD62L⁺, Tcm), которые способны рециркулировать в лимфоидных органах, секретировать IL-2;

– эффекторные (CD45RO⁺CCR7⁺CD62L⁻, Tem), которые экспрессируют хемокины для миграции в органы и ткани, продуцируют эффекторные цитокины, перфорин, гранзимы;

– терминально дифференцированные клетки памяти (CD45RA⁺CCR7⁻CD62L⁻);

– редкую субпопуляцию стволовых клеток памяти (CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), которая является переходной между наивными Т-клетками и основными субпопуляциями клеток памяти и имеет способность к длительному поддержанию в организме.

В процессах выживания, поддержания, как и гомеостатической пролиферации Т-клеток, веду-

шую роль играет IL-7, в большей степени от него зависят наивные CD4⁺ лимфоциты, CD4⁺Tcm и Tem клетки [5, 8, 12]. Поддерживающий эффект IL-7 обеспечивается его связыванием с высокоаффинной α -цепью рецептора к IL-7 (IL-7R α , CD127) и запуском сигнального пути, который начинается с активации тирозинкиназ Jak1 и Jak3, связанных с α -цепью и общей γ -цепью (CD132). В результате происходит фосфорилирование и димеризация транскрипционного фактора STAT5, который мигрирует в ядро и регулирует транскрипцию генов [15].

В последнее время исследователи отмечают вовлеченность гомеостатического фактора IL-7 в патогенезе аутоиммунных заболеваний. Прямое действие IL-7 на Т-клетки способствует продукции преимущественно цитокинов Th1- и Th17-типа [13]. Данный цитокин обеспечивает Т-зависимую активацию макрофагов, дендритных клеток и В-клеток, что сопровождается увеличением экспрессии дифференцировочных факторов, хемокинов, адгезивных и костимуляторных молекул, катаболических ферментов [4]. Кроме того, высказывается предположение, что аутореактивные клоны Т-клеток могут поддерживаться IL-7, что в результате приводит к хроническому течению аутоиммунного заболевания.

При многих аутоиммунных заболеваниях уровень IL-7 повышен в сыворотке крови [25], а при ревматоидном артрите его концентрация существенно увеличена в синовиальной жидкости [6, 20]. При этом у пациентов с аутоиммунной патологией наблюдается накопление Т-клеток памяти. Так, согласно литературным данным, количество центральных клеток памяти CD4⁺CD45RA⁻CD62L⁺ и CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁺ повышено у пациентов с ревматоидным артритом по сравнению с донорами, в то время как число терминально дифференцированных эффекторных клеток памяти остается на уровне донорских значений [14]. Все эти данные дают основание предполагать, что механизмы поддержания Т-клеток в условиях воспаления могут иметь отличия. Поэтому **целью данной работы** было исследование влияния IL-7 на поддержание, пролиферацию CD4⁺ центральных и эффекторных клеток памяти в норме и в условиях воспаления *in vitro*.

Материалы и методы

В исследование вошли 15 условно-здоровых доноров (мужчин и женщин), в возрасте от 28 до 58 лет (средний возраст – 48±2,7 лет). Набор доноров в группу осуществлялся после подписания информированного согласия.

Получение и культивирование клеток периферической крови

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,082$ г/л) (BioClot GmbH, Германия). При-

липающую фракцию получали путем культивирования выделенных МНК в чашке Петри в среде RPMI-1640 (ООО «ПанЭко»), дополненной гентамицином (50 мкг/мл, ООО «Дальхимфарм»), тиенамом (25 мкг/мл, Merck Sharp & Dohme Corp., США) и 10% FCS (HyClone, США) (полная культуральная среда), в течение 1 часа во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С. Неприлипающую фракцию клеток аккуратно собирали и использовали для последующей сортировки на CD4⁺ центральные и эффекторные клетки памяти. При отработке модели неприлипающую фракцию без сортировки использовали для культивирования с прилипающей фракцией.

Прилипающую фракцию переносили в лунки 24-луночных планшетов trans-well (BioFill, Китай) с культурными вставками и культивировали в объеме 0,5 мл в полной культуральной среде в отсутствие и присутствии липополисахарида LPS 055:b5 (Sigma, США) в конечной концентрации 10 мкг/мл. Оптимальное время для культивирования составило 18-20 часов.

Клетки прилипающей фракции собирали, центрифугировали и удаляли супернатант. После чего клетки сокультивировали с сортированными CD4⁺ центральными или эффекторными клетками памяти в 24-луночных планшетах trans-well (BioFill, Китай) с культурными вставками в условиях наличия/отсутствия контакта в присутствии или отсутствии IL-7 (50 нг/мл, PeproTech, США) в течение 6 дней во влажной атмосфере с 5%-ным CO₂ при 37 °С. Схематично дизайн эксперимента представлен на рисунке 1.

Сортировка CD4⁺ центральных и эффекторных клеток памяти

Популяции CD4⁺ центральных и эффекторных клеток памяти получали из неприлипающей фракции МНК методом магнитной сортировки, используя частицы, колонки и необходимое оборудование компании Miltenyi Biotec (США). CD4⁺45RO⁺CCR7⁻ (эффекторные, Tem) клетки памяти получали с помощью негативной магнитной сортировки, CD4⁺45RO⁺CCR7⁺ (центральные, Tcm) клетки памяти получали в 2 этапа: сначала проводили негативную сортировку CD4⁺45RO⁺ клеток, потом – позитивную сортировку из них CCR7⁺ клеток. Часть выделенных клеток окрашивали моноклональными антителами против CD4, CD45 и CCR7, которые указаны в панели 1 ниже, и проводили цитометрический анализ. Чистоту сортировки определяли из гейта CD4⁺ лимфоцитов. Для CD4⁺ центральных клеток памяти чистота сортировки в среднем составила 87±4,9%, для CD4⁺ эффекторных клеток памяти – 79±2,5%. Перед сокультивированием с прилипающей фракцией отсортированные клетки окрашивали витальным красителем CFSE (4 мкМ, Molecular probe, США) для последующей

оценки пролиферативного ответа клеток памяти на IL-7.

Определение концентрации IL-1 β и TNF α

Продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α определяли в супернатантах культур с прилипающей фракцией, стимулированной и нестимулированной LPS, методом иммуноферментного анализа. Для определения использовали диагностические наборы АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), основанные на «сэндвич»-варианте твердофазного ИФА, и включающие калибровочные образцы. Супернатанты от стимулированных LPS культур перед проведением анализа разбавляли в 10 раз средой RPMI-1640. Величину оптической плотности в лунках измеряли спектрофотометром Multimode Reader TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Germany) при длине волны 450 нм, в качестве референса использовалась длина волны 620 нм. Определение проводили в дублях, поэтому результат представлял среднее арифметическое значение, полученное из 2 лунок.

Проточная цитофлуориметрия

Клетки периферической крови и клетки после культивирования окрашивали конъюгированными с флуорохромами моноклональными антителами к поверхностным маркерам CD4⁺Tcm и Tem, α -цепи рецептора для IL-7, общей γ -цепи, лимфоцитарному рецептору CD5. Использовались следующие панели: 1. CD4-PE (ООО «Сорбент»), CD45RO-PE/Cy7 (BioLegend, США), CD197(CCR7)-APC/Cy7 (BioLegend, США), CD127-PerCP/Cy5.5 (BioLegend, США), CD132-APC (BioLegend, США), 2. с использованием антител BioLegend (США) CD4-PerCP/Cy5.5, CD45RO-APC, CD197(CCR7)-APC/Cy7, CD5-PE/Cy7. Окрашивание проводили комбинацией антител согласно протоколу, рекомендованному производителем. Фенотипирование клеточных

популяций и исследование пролиферативной активности проводили на клеточном анализаторе FACS CantoII (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения FACS Diva 6.1 (Becton Dickinson, США).

Анализ пролиферативной активности на IL-7 заключался в определении относительного числа пролиферирующих клеток, окрашенных CFSE, по уровню их флуоресценции и не включал в себя пик неделящихся клеток.

Статистическая обработка

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 (Statsoft, США). Поскольку распределение показателей не всегда соответствовало нормальному распределению, согласно критерию Шапиро–Уилка, применялись методы непараметрической статистики. Для сравнения связанных переменных использовали парный критерий Вилкоксона, а для оценки несвязанных переменных – критерий Манна–Уитни. Выявленные отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Разработка модели воспаления *in vitro*

На первом этапе работы была разработана модель воспаления *in vitro*, которая основана на обработке прилипающей фракции МНК липополисахаридом (LPS) с целью индукции продукции провоспалительных цитокинов (рис. 1). Мы подобрали оптимальное время для активации прилипающей фракции МНК, чтобы продукция провоспалительных цитокинов сохранялась при последующем сокультивировании с Т-клетками памяти. Время активации прилипающей фракции МНК LPS составило 18–20 часов. Согласно данным литературы, пик продукции провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α приходится на первые 24 часа после активации [1]. Мы определили содержание IL-1 β и TNF α в супернатантах культур без стимуляции и со стимуляцией LPS. Под действием LPS уровень продукции IL-1 β и TNF α увеличивался в супернатантах культур с прилипающей фракцией почти в 10 раз относительно нестимулированных культур (рис. 2).

Для тестирования модели были проведены эксперименты на 5 донорах без сортировки (то есть с МНК), в которых определяли содержание наивных Т-клеток и клеток памяти, а также число пролиферирующих клеток каждой субпопуляции в присутствии и отсутствие IL-7. При раздельном культивировании клеток под влиянием IL-7 наблюдалось достоверное увеличение числа CD4⁺Tcm и снижение терминально дифференцированных CD4⁺45RO⁺CCR7⁻ клеток памяти относительно клеток, культивированных без разделения со стимуляцией IL-7 (табл. 1). Предобработка прилипающей фракции МНК LPS с целью индукции продукции провоспалительных

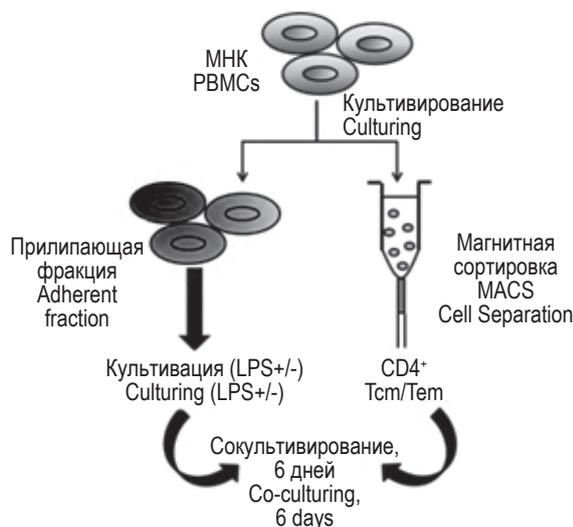


Рисунок 1. Дизайн эксперимента

Figure 1. Design of experiment

цитокинов также приводила к повышению доли CD4⁺T_{em} в культурах в присутствии IL-7.

В отсутствие контакта с АПК CD4⁺T_{em} больше пролиферировали в ответ на IL-7, чем в обычных условиях (табл. 1). Вследствие индивидуальной чувствительности клеток доноров на стимуляцию LPS и гомеостатическим фактором, а также малой выборки разница между клетками, предварительно обработанными и не обработанными LPS, носила характер тенденции.

Таким образом, в культурах *in vitro* в условиях действия провоспалительных цитокинов происходит накопление CD4⁺T_{em}.

Участие IL-7 в поддержании CD4⁺ центральных и эффекторных клеток памяти в норме и в условиях воспаления *in vitro*

При культивировании процентное содержание сортированных популяций CD4⁺T_{em} достоверно не изменялось. В отличие от T_{em} доля T_{em} клеток снижалась примерно до 50% в присутствии IL-7.

Ответ Т-клеток памяти на IL-7 варьировал у различных индивидуумов. В целом T_{em} обладали лучшей пролиферативной активностью в ответ на IL-7, чем T_{em}-клетки: достоверно больше была доля пролиферирующих клеток, а также клетки совершили большее число делений (табл. 2). Клеточные контакты с АПК прилипающей фракции способствовали лучшей пролиферации T_{em} как в обычных условиях, так и в условиях воспаления (предобработки LPS). Однако достоверных отличий по отвечаемости T_{em} на IL-7 в норме и модели воспаления *in vitro* не было выявлено (4,9% пролиферирующих клеток против 5,9% клеток). Под действием IL-7 уровень пролиферации T_{em} имел тенденцию к снижению в отсутствие контакта с МНС, тем не менее предобработка LPS в этих условиях напротив увеличивала число пролиферирующих клеток.

Таким образом, можно сказать, что IL-7 способствует поддержанию CD4⁺T_{em} и T_{em} в отсутствие контакта с МНС, в то же время степень пролиферации клеток снижается, возможно, из-за недостаточной их активации при отсутствии дополнительных костимулирующих сигналов. В модели воспаления *in vitro* наблюдалось изменение необходимых требований для поддержания T_{em}: происходило усиление пролиферативного ответа на IL-7 в отсутствие контакта с МНС. Для T_{em} механизм поддержания в условиях воспаления остался прежним.

Экспрессия рецептора к IL-7 и CD5 на CD4⁺ центральных и эффекторных клетках памяти в норме и в модели воспаления *in vitro*

Поскольку действие IL-7 напрямую связано с присутствием на поверхности Т-клеток рецептора для IL-7 (IL-7R), мы оценили, как изменяется экспрессия α-цепи рецептора к IL-7 и общей γ-цепи в культурах в норме и в условиях воспаления. При культивировании без стимуляции (к

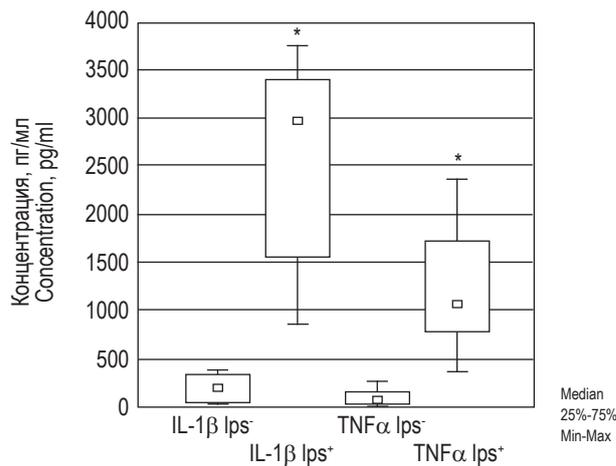


Рисунок 2. Уровень спонтанной (lps⁻) и LPS-индуцированной (lps⁺) продукции IL-1β и TNFα в супернатантах культур прилипающей фракции МНК здоровых доноров (n = 8)

Примечание. * – достоверные отличия по сравнению со спонтанной продукцией (парный тест Вилкоксона), p < 0,05.

Figure 2. Level of spontaneous (lps⁻) and LPS-induced (lps⁺) production of IL-1β and TNFα in supernatants of adherent fraction of PBMCs from healthy donors (n = 8)

Note. *, significant differences compared to spontaneous production (paired Wilcoxon test), p < 0.05.

значительно увеличилось содержание T_{em} и T_{em}, экспрессирующих α-цепь IL-7R, а также число двойных позитивных по CD127 и CD132 клеток по сравнению с T_{em}- и T_{em}-клетками периферической крови (рис. 3). Стимуляция IL-7 приводила к снижению числа CD127-позитивных клеток среди обеих популяций CD4⁺ клеток памяти, при этом достоверно увеличивалось соотношение CD132⁺ лимфоцитов.

В отсутствие контакта с МНС доля CD127⁺CD132⁺T_{em}- и T_{em}-клеток достоверно снижалась по сравнению с клетками, культивированными без разделения мембраной. Данные изменения наблюдались как при предварительной обработке прилипающей фракции LPS, так и без нее. В модели воспаления *in vitro* не было выявлено отличий по уровню экспрессии CD127 и CD132 на T_{em}-клетках в присутствии IL-7 по сравнению с нормой. Однако предобработка LPS способствовала увеличению числа CD127⁺CD132⁺ клеток среди T_{em} почти в 2 раза.

Для косвенной характеристики аффинности ТКР к собственным антигенам мы использовали молекулу CD5. Все Т-клетки экспрессируют CD5, но самая высокая экспрессия CD5 (CD5^{high}) характерна для клеток с большим сродством ТКР к аутологичным пептидам [2].

В нашем исследовании T_{em} имели более высокую экспрессию CD5, чем T_{em} (рис. 4). T_{em} не

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ CD4⁺ КЛЕТОК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ЧИСЛО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРАХ *IN VITRO* (n = 5), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. PROPORTION OF DIFFERENT CD4⁺ SUBSETS FROM HEALTHY DONORS AND NUMBER OF PROLIFERATED CELLS IN CULTURES *IN VITRO* (n = 5), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Субпопуляционный состав CD4 ⁺ лимфоцитов Content of CD4 ⁺ subsets				Число пролиферирующих клеток Proliferated cells			
	Tn, %	Tcm, %	Tem, %	Temra, %	Tn, %	Tcm, %	Tem, %	Temra, %
k_lps-	44,7 (32,6-52,8)	14,9 (14,8-25,9)	25,2 (17,4-32,3)	5,3 (4,5-9,6)	1,6 (1,5-1,9)	3,7 (1,7-4,5)	2,1 (1,0-2,2)	1,5 (1,4-2,6)
k_lps+	45,2 (41,1-53,2)	18,1 (14,2-24,8)	23,6 (19,7-25,9)	5,3 (4,0-11,9)	2,3 (1,9-2,4)	4,7 (3,4-5,4)	2,1 (1,9-2,3)	1,9 (0,8-1,9)
IL-7 lps-	51,9 (43,0-55,1)	20,8 (13,0-27,6)	22,6 (18,2-24,4)	6,4 (4,6-14,3)	2,8 (2,5-3,5)	9,7 (6,7-11,0)	3,7 (3,5-3,9)	2,9 (2,4-3,3)
IL-7 lps+	52,8 (48,6-53,9)	25,6 (12,5-27,6) [#]	21,7 (18,5-22,8)	5,9 (4,3-13,9)	3,9 (2,9-4,3)	10,1 (8,6-14,2)	5,7 (5,0-11,9)	3,3 (3,2-3,8)
IL-7_tr lps-	53,1 (52,7-53,9)	22,1 (14-34) [#]	19 (14,1-19,7) [*]	4,8 (3,8-10,0) [#]	3,4 (3,2-3,6)	13,9 (12,8-20,9) [#]	7,9 (5,1-11,1)	4,1 (3,9-5,8)
IL-7_tr lps+	54,3 (51,8-55,6)	19,3 (13,4-33,7)	18 (15,8-18,6) [*]	4,5 (4,3-9,9) [#]	4,6 (2,8-4,7)	18,9 (13,9-20,8)	10,3 (8,8-14,6)	3,7 (3,7-6,6)

Примечание. k – контроль без стимуляции; lps- – прилипающая фракция МНК предварительно не была обработана LPS; lps+ – прилипающая фракция МНК предварительно была обработана LPS. IL-7_tr означает, что прилипающая и неприлипающая фракции культивировались отдельно. Tn – наивные Т-клетки, Tcm – центральные Т-клетки памяти, Tem – эффекторные Т-клетки памяти, Temra – терминально-дифференцированные Т-клетки памяти. * – достоверное отличие по сравнению с контролем без стимуляции k_lps-, p < 0,05; # – достоверное отличие по сравнению со стимуляцией IL-7, p < 0,05.

Note. k, culture without stimulation; lps-, untreated adherent fraction of PBMCs; lps+, pretreated with LPS adherent fraction of PBMCs. IL-7_tr, adherent fraction of PBMCs and memory T cells cultured in trans-wells. Tn, naive T cells; Tcm, central memory T cells; Tem, effector memory T cells; Temra, effector memory re-expressing CD45RA. *, significant differences compared to cells without stimulation k_lps-, p < 0.05; #, significant differences compared to cells stimulated with IL-7, p < 0.05.

ТАБЛИЦА 2. ЧИСЛО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ CD4⁺ ЦЕНТРАЛЬНЫХ И ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК ПАМЯТИ В ОТВЕТ НА IL-7 В НОРМЕ И МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ *IN VITRO*, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. NUMBER OF PROLIFERATED CD4⁺ CENTRAL AND EFFECTOR MEMORY CELLS UNDER IL-7 IN NORM AND IN THE INFLAMMATORY MODEL *IN VITRO*, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Число пролиферирующих клеток Proliferated cells	
	CD4 ⁺ Tcm, %	CD4 ⁺ Tem, %
k	0,5 (0,2-3,6)	1,9 (1,0-9,1)
IL-7	4,9 (2,2-6,7) [*]	2,1 (1,1-6,5)
IL-7_tr	2,2 (1,6-7,4)	1,2 (0,7-6,7)
IL-7 lps+	5,9 (4,9-6,8) [*]	1,9 (0,9-2,7)
IL-7_tr lps+	3,0 (2,3-7,4)	2,6 (1,4-5,3)

Примечание. k – контроль без стимуляции; lps+ – прилипающая фракция МНК предварительно была обработана LPS. IL-7_tr означает, что прилипающая и неприлипающая фракции культивировались отдельно. * – достоверное отличие по сравнению с контролем без стимуляции k, p < 0,05.

Note. k, culture without stimulation; lps+, pretreated with LPS adherent fraction of PBMCs; IL-7_tr, adherent fraction of PBMCs and memory T cells cultured in trans-wells. *, significant differences compared to cells without stimulation k, p < 0.05.

менее в культурах без стимуляции уровень экспрессии данного маркера сохранялся на Tem, тогда как среди Tcm число CD5^{high} клеток снижалось более чем в 2 раза. При этом стимуляция IL-7 поддерживала уровень экспрессии CD5, сопоста-

вимый с уровнем экспрессии в периферической крови только на Tcm клетках. Можно предположить, что CD4⁺Tcm-клетки с высоким сродством к аутологичным антигенам зависимы от наличия гомеостатических факторов, в частности IL-7.

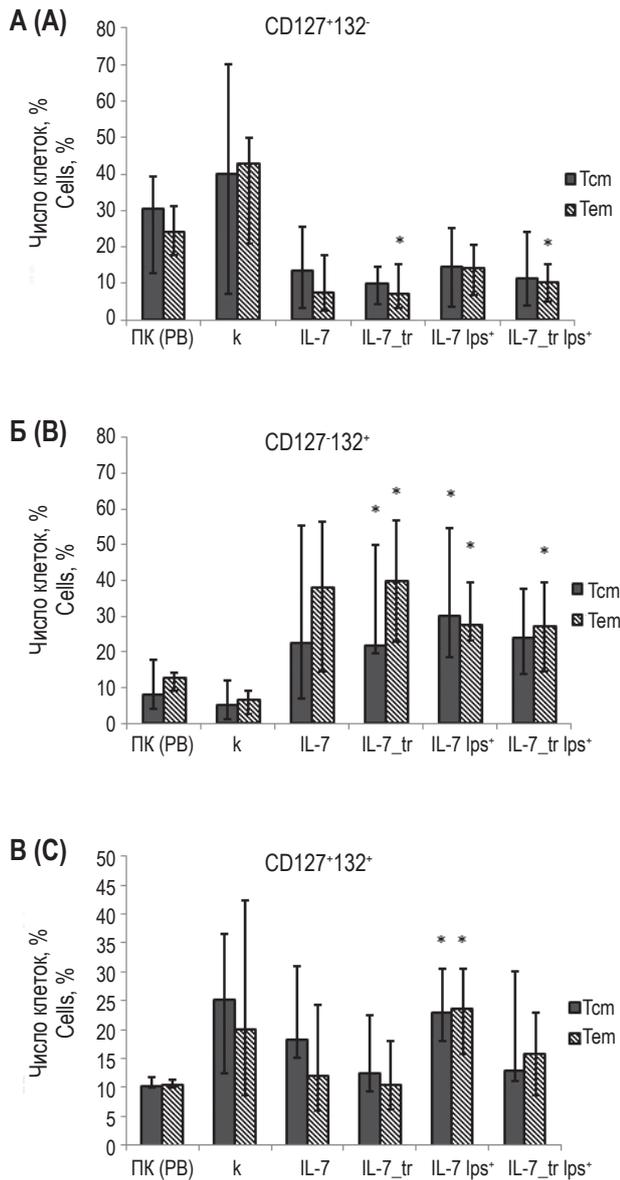


Рисунок 3. Экспрессия CD127 и CD132 на CD4⁺ центральных и эффекторных клетках памяти в периферической крови и культурах *in vitro*
Примечание. А – число CD127⁺CD132⁺ клеток. Б – число CD127⁺CD132⁺ клеток. В – число CD127⁺CD132⁺ клеток. ПК – периферическая кровь; k – контроль без стимуляции; lps⁺ – прилипающая фракция МНК предварительно была обработана LPS. IL-7_tr означает, что прилипающая и неприлипающая фракции культивировались отдельно. * – достоверные отличия по сравнению с клетками памяти периферической крови, p < 0,05.

Figure 3. CD127 and CD132 expression on CD4⁺ central and effector memory cells in peripheral blood and cultures *in vitro*
Note. A, proportion of CD127⁺CD132⁺ cells. B, proportion of CD127⁺CD132⁺ cells. C, proportion of CD127⁺CD132⁺ cells. PB, peripheral blood; k, culture without stimulation; lps⁺, pretreated with LPS adherent fraction of PBMCs. IL-7_tr, adherent fraction of PBMCs and memory T cells cultured in trans-wells. *, significant differences compared to cells from peripheral blood, p < 0.05.

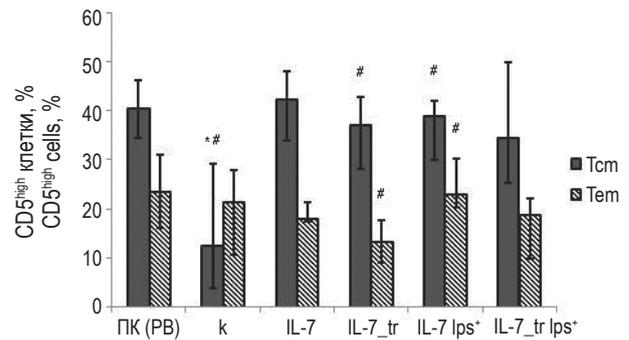


Рисунок 4. Число CD5^{high} клеток среди CD4⁺ центральных и эффекторных клеток памяти в периферической крови и культурах *in vitro*

Примечание. ПК – периферическая кровь; k – контроль без стимуляции; lps⁺ – прилипающая фракция МНК предварительно была обработана LPS. IL-7_tr означает, что прилипающая и неприлипающая фракции культивировались отдельно. * – достоверные отличия по сравнению с клетками памяти периферической крови, p < 0,05; # – достоверное отличие по сравнению со стимуляцией IL-7, p < 0,05.

Figure 4. Content of CD5^{high} cells among CD4⁺ central and effector memory cells in peripheral blood and in cultures *in vitro*
Note. PB, peripheral blood; k, culture without stimulation; lps⁺, pretreated with LPS adherent fraction of PBMCs. IL-7_tr, adherent fraction of PBMCs and memory T cells cultured in trans-wells. *, significant differences compared to cells from peripheral blood, p < 0.05; #, significant differences compared to cells stimulated with IL-7, p < 0.05.

Раздельное культивирование клеток с использованием культуральных вставок способствовало достоверному снижению числа CD5^{high} клеток среди обеих популяций CD4⁺ клеток памяти. Активация прилипающей фракции LPS приводила к разнонаправленному действию на Tcm и Tem клетки с высокой экспрессией CD5. Доля CD5^{high} лимфоцитов среди Tem снижалась в условиях действия провоспалительных факторов (39% против 42,4%). Тогда как наблюдалось поддержание CD5^{high} Tem под действием IL-7 в условиях воспаления *in vitro* наравне с уровнем в периферической крови.

Таким образом, было установлено, что клетки с высоким сродством ТКР к аутологичным антигенам чувствительны к наличию контакта с АПК. Кроме того, в условиях воспаления обеспечивается лучшее поддержание Tem клеток с высокой экспрессией CD5.

Обсуждение

Известно, что IL-7Rα экспрессирован на наивных Т-клетках и Т-клетках памяти [21]. В процессе активации и дифференцировки Т-клеток уровень мембранной экспрессии рецептора регулируется, что влияет на способность клеток отвечать на IL-7 [21]. После встречи с антигеном наивные Т-клетки дифференцируются в эффек-

торные Т-лимфоциты и утрачивают экспрессию IL-7R α . Однако при переходе эффекторных Т-клеток в пул клеток памяти экспрессия IL-7R α возобновляется, что обеспечивает их длительное поддержание в организме [21]. В данной работе мы провели исследование пролиферативной активности CD4⁺T_{em} и T_{em}, динамику экспрессии субъединиц рецептора к IL-7 и молекулы CD5 в ответ на IL-7 *in vitro* в норме и под действием провоспалительных факторов. T_{em} обладали достоверно большей пролиферативной активностью в ответ на IL-7, чем T_{em}, что согласуется с полученными ранее данными. В литературе сообщалось, что в центральных клетках памяти при стимуляции IL-2 и IL-7 *in vitro* детектируется более высокий уровень фосфорилированного STAT5 [18], что может говорить в пользу большего ответа данной популяции на IL-7. Отсутствие контактов с антигенпрезентирующими клетками снижало уровень пролиферации в ответ на IL-7 в обеих субпопуляциях клеток памяти. В условиях воспаления *in vitro* достоверных изменений по числу пролиферирующих на IL-7 Т-клеток памяти не было выявлено. Исключением стали T_{em}, которые, напротив, увеличили пролиферативную активность в условиях воспаления и отсутствия контакта с МНС.

По уровню экспрессии CD127 субпопуляции CD4⁺ клеток памяти достоверно не отличались. Стимуляция IL-7 приводила к снижению числа CD127-позитивных T_{em}- и T_{em}-клеток. Показано, что в процессе связывания IL-7 с IL-7R α образуется комплекс, который подвергается интернализации внутрь клетки и последующей протеосомной и лизосомальной деградации; трансдукция сигнала от данного комплекса негативно регулирует экспрессию гена IL-7R α [10]. Таким образом, после активации IL-7 Т-клетки утрачивают поверхностную экспрессию CD127, что препятствует в дальнейшем связыванию с данным цитокином. Механизм такой негативной обратной связи регулирует чрезмерную стимуляцию Т-клеток.

В модели воспаления *in vitro* при добавлении IL-7 увеличилась доля CD127⁺CD132⁺T_{em}, однако, влияния на экспрессию субъединиц IL-7R T_{em} под действием провоспалительных факторов не было выявлено. Интересно, что по данным литературы, обнаруженное у пациентов с сахарным диабетом 1 типа увеличение экспрессии γ -цепи и IL-7R α на CD4⁺ клетках памяти воздействовало на передачу сигналов от рецептора и продукцию цитокинов эффекторными Т-клетками [23]. Отсутствие контактов с АПК приводило к снижению содержания CD127⁺CD132⁺ клеток в обеих субпопуляциях Т-клеток памяти, что может говорить о необходимости в дополнительном сигнале при стимуляции IL-7.

В научном сообществе продолжительное время преобладала гипотеза о конститутивной экс-

прессии Т-лимфоцитами общей γ -цепи, и до сих пор остается невыясненным механизм регуляции ее экспрессии на транскрипционном уровне [24]. Тем не менее, в нескольких исследованиях было показано увеличение экспрессии γ -цепи после активации, опосредованной сигналом через Т-клеточный рецептор, инфекционным агентом, а также после стимуляции цитокинами [11, 16, 22]. В нашем исследовании стимуляция IL-7 также приводила к увеличению экспрессии CD132 на CD4⁺T_{em} и T_{em}. Показано, что быстрое повышение числа молекул CD132 на поверхности Т-клетки после активации связано с транслокацией внутриклеточного запаса белкового рецептора на поверхность мембраны [3].

Таким образом, мы установили, что в условиях воспаления механизм поддержания CD4⁺T_{em} схож с таковым в физиологических условиях. Тогда как механизм поддержания CD4⁺T_{em} в условиях действия провоспалительных факторов имеет небольшие отличия. Кроме того, несмотря на то, что для гомеостаза Т-клеток памяти контакт с МНС не является необходимым требованием, в нашем исследовании он обеспечивал более высокий уровень пролиферации центральных и эффекторных Т-клеток памяти и долю CD127⁺CD132⁺ клеток.

На следующем этапе мы исследовали влияние воспалительного окружения и IL-7 на потенциально аутореактивные Т-клетки, т.е. Т-клетки с повышенным сродством к собственным антигенам, которые мы определяли по экспрессии CD5. Молекула CD5 представляет собой мембранный гликопротеин, ассоциированный с ТКР, который обладает разнообразными функциями. Так, было показано, что CD5 опосредует выживание тимоцитов в тимусе во время селекции, а также Т-клеток на периферии [7, 17, 26]. Наиболее привлекающая внимание исследователей функция CD5 – негативная регуляция сигнала через ТКР, при этом уровень экспрессии CD5 на поверхности Т-клетки коррелирует со степенью сродства ТКР к комплексу МНС-собственный пептид [2]. Следовательно, потенциально аутореактивные Т-клетки обладают более высокой экспрессией CD5. В нашем исследовании мы показали, что среди CD4⁺T_{em} периферической крови большее количество клеток с высокой экспрессией CD5, чем среди CD4⁺T_{em}. В культурах *in vitro* IL-7 способствовал поддержанию высокой экспрессии CD5 на T_{em} в обычных условиях и на T_{em} в условиях действия провоспалительных факторов. Отсутствие контакта с МНС негативно влияло на экспрессию CD5 на обеих субпопуляциях CD4⁺ клеток памяти. В экспериментальной модели по переносу клонов Т-клеток с высокой и умеренной экспрессией CD5 (LLO56 и LLO118 соответственно) дефицитным по МНС II класса мышам также наблюдалось снижение экспрессии CD5. Что, по-видимому, связано с динамичной регуля-

цией данной молекулы сигналами от комплекса МНС-собственный пептид [19]. Кроме того, авторы высказывают предположение, что сложные взаимодействия ТКР с МНС, опосредованный CD5 «тюнинг» сигнала играют важную роль в определении уровня ответа Т-клетки на стимулы (собственные или чужеродные антигены) и в передаче базального сигнала внутрь клетки, что влияет на функциональные характеристики CD4⁺ лимфоцита. Эти индивидуальные особенности CD4⁺ лимфоцитов закладываются в тимусе на этапе селекции.

Таким образом, в нашем исследовании было показано, что IL-7 способствует поддержанию CD4⁺Tcm и Tcm с высокой экспрессией CD5, что можно рассматривать в качестве одного из механизмов поддержания ауто-реактивных Т-клеточных клонов при аутоиммунной патологии.

Заключение

В разработанной нами модели воспаления *in vitro*, основанной на индукции LPS провоспалительных цитокинов клетками прилипающей фракции, было показано, что механизм поддержания CD4⁺Tcm при участии IL-7 реализуется так же, как в норме. Однако для популяции CD4⁺Tcm в условиях действия провоспалительных факторов наблюдалось увеличение числа активирован-

ных CD127⁺CD132⁺ клеток и CD5^{high} клеток, усиление пролиферативной активности в ответ на IL-7 при отсутствии контакта с МНС, что может говорить об изменениях механизма поддержания данной популяции.

В целом полученные данные о снижении пролиферативного ответа на IL-7, снижении экспрессии CD132 и высокой экспрессии CD5 в отсутствие контакта с прилипающей фракцией говорят о том, что происходит недостаточная активация Tcm и Tcm. Возможно, это является не столько следствием отсутствия взаимодействия с МНС, а также отсутствием контакта с ко-стимуляторными молекулами, которые также присутствуют на АПК и обеспечивают дополнительные сигналы при активации Т-клеток.

Нами впервые установлено, что IL-7 способствует сохранению CD4⁺Tcm- и Tcm-клеток, высокоэкспрессирующих CD5, что можно рассматривать в качестве механизма поддержания клеток с высокой аффинностью ТКР к аутологичным антигенам, в том числе аутореактивных.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Пашкиной Е.А., научному сотруднику лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ за практические рекомендации в проведении иммуноферментного анализа.

Список литературы / References

1. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике // Цитокины и воспаление, 2003. Т. 2, № 3. С. 20-35. [Demyanov A.V., Kotov A.Yu., Simbircev A.S. Diagnostic value of cytokine studies in clinical practice. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2003, Vol. 2, no. 3, pp. 20-35. (In Russ.)]
2. Azzam H.S., Grinberg A., Lui K., Shen H., Shore E.W., Love P.E. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 188, no. 12, pp. 2301-2311.
3. Bani L., David D., Moreau J.L., Cayota A., Nakarai T., Ritz J., Thèzy J. Expression of the IL-2 receptor gamma subunit in resting human CD4 T lymphocytes: mRNA is constitutively transcribed and the protein stored as an intracellular component. *Int. Immunol.*, 1997, Vol. 9, no. 4, pp. 573-580.
4. Bikker A., Hack C.E., Lafeber F.P., van Roon J.A. Interleukin-7: a key Mediator in T cell-driven autoimmunity, inflammation, and tissue destruction. *Curr. Pharm. Des.*, 2012, Vol. 18, no. 16, pp. 2347-2356.
5. Caserta S., Zamoyska R. Memories are made of this: synergy of T cell receptor and cytokine signals in CD4(+) central memory cell survival. *Trends Immunol.*, 2007, Vol. 28, no. 6, pp. 245-248.
6. Churchman S.M., Ponchel F. Interleukin-7 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, Vol. 47, no. 6, pp. 753-759.
7. Friedlein G., El Hage F., Vergnon I., Richon C., Saulnier P., Lecluse Y., Caignard A., Boumsell L., Bismuth G., Chouaib S., Mami-Chouaib F. Human CD5 protects circulating tumor antigenspecific CTL from tumor-mediated activation-induced cell death. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 11, pp. 6821-6827.
8. Fry T.J., Connick E., Fallon J., Lederman M.M., Liewehr D.J., Spritzler J., Steinberg S.M., Wood L.V., Yarchoan R., Zuckerman J., Landay A., Mackall C.L. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 10, pp. 2983-2990.
9. Gattinoni L., Speiser D.E., Lichterfeld M., Bonini C. T memory stem cells in health and disease. *Nat. Med.*, 2017, Vol. 23, no. 1, pp. 18-27.
10. Henriques C.M., Rino J., Nibbs R.J., Graham G.J., Barata J.T. IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7Ralpha in T cells. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 16, pp. 3269-3277.
11. Hong C., Luckey M.A., Ligons D.L., Waickman A.T., Park J.Y., Kim G.Y., Keller H.R., Etzensperger R., Tai X., Lazarevic V., Feigenbaum L., Catalfamo M., Walsh S.T.R., Park J.-H. Activated T cells secrete an alternatively spliced form of common gamma-chain that inhibits cytokine signaling and exacerbates inflammation. *Immunity*, 2014, Vol. 40, no. 6, pp. 910-923.

12. Lenz D.C., Kurz S.K., Lemmens E., Schoenberger S.P., Sprent J., Oldstone M.B., Homann D. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4⁺ T cell memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, Vol. 101, no. 25, pp. 9357-9362.
13. Leung S., Liu X., Fang L., Chen X., Guo T., Zhang J. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell. Mol. Immunol.*, 2010, Vol. 7, no. 3, pp. 182-189.
14. Maldonado A., Mueller Y.M., Thomas P., Bojczuk P., O'Connors C., Katsikis P.D. Decreased effector memory CD45RA⁺CD62L⁻CD8⁺ T cells and increased central memory CD45RA⁻CD62L⁺CD8⁺ T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.*, 2003, Vol. 5, no. 2, pp. R91-R96.
15. Mazzucchelli R., Durum S.K. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 2, pp. 144-154.
16. Nakarai T., Robertson M.J., Streuli M., Wu Z., Ciardelli T.L., Smith K.A., Ritz J. Interleukin 2 receptor gamma chain expression on resting and activated lymphoid cells. *J. Exp. Med.*, 1994, Vol. 180, no. 1, pp. 241-251.
17. Ordoñez-Rueda D., Lozano F., Sarukhan A., Raman C., Garcia-Zepeda E.A., Soldevila G. Increased numbers of thymic and peripheral CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells in the absence of CD5 signaling. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 8, pp. 2233-2247.
18. Paukku K., Silvennoinen O. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2004, Vol. 15, no. 6, pp. 435-455.
19. Persaud S.P., Parker C.R., Lo W.L., Weber K.S., Allen P.M. Intrinsic CD4⁺ T cell sensitivity and response to a pathogen are set and sustained by avidity for thymic and peripheral complexes of self peptide and MHC. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 3, pp. 266-274.
20. Pickens S.R., Chamberlain N.D., Volin M.V., Pope R.M., Talarico N.E., Mandelin A.M. 2nd, Shahrara S. Characterization of interleukin-7 and interleukin-7 receptor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2011, Vol. 63, no. 10, pp. 2884-2893.
21. Read K.A., Powell M.D., McDonald P.W., Oestreich K.J. IL-2, IL-7, and IL-15: multistage regulators of CD4(+) T helper cell differentiation. *Exp. Hematol.*, 2016, Vol. 44, no. 9, pp. 799-808.
22. Sasson S.C., Zaunders J.J., Zanetti G., King E.M., Merlin K.M., Smith D.E., Stanley K.K., Cooper D.A., Kelleher A.D. Increased plasma interleukin-7 level correlates with decreased CD127 and increased CD132 extracellular expression on T cell subsets in patients with HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.*, 2006, Vol. 193, no. 4, pp. 505-514.
23. Seyfarth J., Mütze N., Antony Cruz J., Kummer S., Reinauer C., Mayatepek E., Meissner T., Jacobsen M. CD4⁺ T-cells with high common γ chain expression and disturbed cytokine production are enriched in children with type-1 diabetes. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 820. doi: 10.3389/fimmu.2019.00820.
24. Waickman A.T., Park J.Y., Park J.H. The common gamma-chain cytokine receptor: tricks-and-treats for T cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2016, Vol. 73, no. 2, pp. 253-269.
25. Wang X.S., Li B.Z., Hu L.F., Wen P.F., Zhang M., Pan H.F., Ye D.Q. Perspectives of the relationship between IL-7 and autoimmune diseases. *Clin. Rheumatol.*, 2013, Vol. 32, no. 12, pp. 1703-1709.
26. Zhou X.Y., Yashiro-Ohtani Y., Toyoo-Oka K., Park C.S., Tai X.G., Hamaoka T. and Fujiwara H. CD5 costimulation up-regulates the signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4⁺CD8⁺ thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, no. 3, pp. 1260-1268.

Авторы:

Блинова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Колерова А.В. — аспирант лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Балысников В.Е. — студент ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, научный консультант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Blinova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kolerova A.V., Postgraduate Student, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Balyasnikov V.E., Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Scientific Advisor, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 20.03.2020

Отправлена на доработку 30.04.2020

Принята к печати 29.06.2020

Received 20.03.2020

Revision received 30.04.2020

Accepted 29.06.2020

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕАВТОНОМНЫХ ЭФФЕКТОВ АПОПТОЗА В ПРОЦЕССЕ ИНИЦИАЦИИ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК *IN VITRO* У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Абрамова Т.Я.^{1,2}, Блинова Е.А.¹, Гришина Л.В.¹, Чумасова О.А.¹, Сулутьян А.Э.¹, Сизиков А.Э.¹, Козлов В.А.^{1,2}

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

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Известно, что процессы апоптоза играют важную роль в клеточном гомеостазе, а нарушение клеточной гибели приводит к развитию патологических состояний. С ослаблением апоптоза, как формы запрограммированной клеточной гибели, ассоциируют развитие аутоиммунных процессов и, в частности, ревматоидного артрита.

Целью настоящего исследования являлось определение экспрессии маркеров активации и пролиферации на Т-лимфоцитах в процессе инициации апоптотической гибели клеток в условиях «клеточного соседства» у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом.

Объектом исследования являлись образцы крови пациенток с ревматоидным артритом (РА) и здоровых женщин сопоставимого возраста. Проводились эксперименты, направленные на выявление характера влияния индуцированных в апоптоз не стимулированных, а также α CD3 и дексаметазон (Деха)-стимулированных клеток на аутологичные Т-лимфоциты, пролиферирующие в физиологических условиях *in vitro*.

Создание модели «клеточного соседства» – совместное культивирование CFSE⁻ Т-лимфоцитов, подвергнутых наиболее физиологичному варианту активационного апоптоза (инкубации в условиях скученности и обеднения культуральной среды) и CFSE⁺ аутологичных клеток, пролиферирующих в полной культуральной среде, выявило некоторые закономерности. Была установлена возможность вторичной индукции раннего и позднего апоптоза клеток с помощью и гуморальных, и клеточных компонентов аутологичной культуры, подвергнутой активационному апоптозу. Определены особенности апоптоза в нестимулированных и стимулированных культурах относительно контролей. Выявлено отсутствие различий по параметрам апоптоза во всех исследуемых вариантах культур между пациентами с РА и здоровыми людьми. Установлено повышение содержания живых клеток в CFSE⁻ культуре больных РА относительно доноров.

Адрес для переписки:

Абрамова Татьяна Яковлевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и фундаментальной иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru

Address for correspondence:

Abramova Tatiana Ya.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 227-01-35.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru

Образец цитирования:

Т.Я. Абрамова, Е.А. Блинова, Л.В. Гришина, О.А. Чумасова, А.Э. Сулутьян, А.Э. Сизиков, В.А. Козлов «Исследование неавтономных эффектов апоптоза в процессе инициации апоптотической гибели клеток *in vitro* у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 847-866.
doi: 10.15789/1563-0625-SON-1991

© Абрамова Т.Я. и соавт., 2020

For citation:

T. Ya. Abramova, E. A. Blinova, L. V. Grishina, O. A. Chumasova, A. E. Sulutyayn, A. E. Sizikov, V. A. Kozlov "Studies of non-autonomous effects of apoptosis in the course of *in vitro* apoptotic cell death initiation in healthy persons and patients with rheumatoid arthritis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 847-866.
doi: 10.15789/1563-0625-SON-1991

DOI: 10.15789/1563-0625-SON-1991

Определены более высокие параметры активации CD25⁺ и CD69⁺ лимфоцитов и более низкие маркеров пролиферации Ki-67⁺ в группе доноров относительно пациентов. В отличие от здоровых людей, у пациентов с РА установлено значимое повышение экспрессии Ki-67 на Т-лимфоцитах в динамике совместного культивирования CFSE⁻ и CFSE⁺ культур. Увеличение числа живых клеток в апоптотических культурах больных РА относительно здоровых людей на фоне отсутствия значимых различий по параметрам апоптоза и динамики активационных маркеров, а также характер изменений содержания клеток несущих Ki-67 свидетельствует о вкладе неавтономных эффектов апоптоза в клеточный гомеостаз у пациентов с РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, апоптоз, «клеточное соседство», маркеры активации, маркеры пролиферации, неавтономные эффекты апоптоза

STUDIES OF NON-AUTONOMOUS EFFECTS OF APOPTOSIS IN THE COURSE OF *IN VITRO* APOPTOTIC CELL DEATH INITIATION IN HEALTHY PERSONS AND PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Abramova T.Ya.^{a, b}, Blinova E.A.^a, Grishina L.V.^a, Chumasova O.A.^a, Sulutyan A.E.^a, Sizikov A.E.^a, Kozlov V.A.^{a, b}

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

^b Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The process of apoptosis is known that play an important role in cellular homeostasis, and the altered cell death may lead to development of pathological disorders. Evolving autoimmune conditions, in particular, rheumatoid arthritis, are associated with decreased rates of apoptosis as a form of programmed cell death. The aim of this study was to evaluate expression of activation and proliferation markers on T lymphocytes during initiation of apoptotic cell death under the conditions of “cell neighborhood” in healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis. Patients and methods. The study was performed with blood samples of the patients with rheumatoid arthritis (RA) and healthy women of comparable age. During the study, we conducted experiments aimed to identify the *in vitro* influence of non-stimulated apoptosis-induced cells, as well as aCD3- and dexamethasone (Dexa)-stimulated apoptosis-induced cells upon autologous T lymphocytes cultured under physiological conditions. Development of a “cell neighborhood” model, i.e., co-cultures of CFSE⁻ T cells subjected to incubation under crowding condition and depletion of the culture medium which is the most physiological variant of apoptosis activation, and CFSE⁺ autologous cells placed in the complete culture medium, has revealed some relationships. We have revealed an opportunity of secondary induction of early and late apoptosis by means of humoral and cellular components of autologous cell culture subjected to activation apoptosis. We determined the features of apoptosis in unstimulated, as well as aCD3- and dexamethasone-stimulated cultures, compared with controls. There were no differences in these parameters of apoptosis between RA patients and healthy people for all variants of cultures. An increased proportion of viable cells was found in the CFSE⁻ culture of patients with RA when compared to donors.

The donor group had more lymphocytes with activation parameters CD25⁺, CD69⁺ and low level of proliferation marker Ki-67 than patients. In contrast to healthy, the RA patients demonstrated a significantly increased expression of Ki 67 in T lymphocytes when co-culturing CFSE⁻ and CFSE⁺ cells. An increased number of living cells in apoptotic cultures of patients with RA relative to healthy people, in absence of significant differences in the parameters of apoptosis and activation markers in dynamics, as well as pattern of changes in the Ki-67⁺ cell contents suggested a contribution of the non-autonomous effects of apoptosis to cellular homeostasis in RA patients.

Keywords: rheumatoid arthritis, apoptosis, cell neighborhood, activation markers, proliferation markers, non-autonomous effects of apoptosis

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-44-540012.

Введение

Ревматоидный артрит (РА) — хроническое аутоиммунное заболевание, приводящее к поражению суставов и системным поражениям внутренних органов [17]. Известно, что РА характеризуется выраженным воспалительным статусом в отношении пролиферации, миграции, апоптоза, экспрессии генов и секреции провоспалительных цитокинов [23].

Исходя из важной роли апоптоза в реализации многообразных физиологических процессов, в настоящее время считается доказанным, что ослабление апоптоза в различной степени отражается на формировании аутоотолерантности и развитии аутоиммунных процессов и заболеваний [16]. Нарушение механизмов индукции апоптоза, приводящие к его ингибированию, являются одним из важных звеньев в патогенезе РА. При ревматоидном артрите суставное воспаление связывают с тем, что зрелые иммунные Т-лимфоциты в синовиальных полостях своевременно не подвергаются запрограммированной клеточной гибели, а продолжают продуцировать провоспалительные цитокины. Помимо этого, в синовиальных Т-лимфоцитах патологически усилена экспрессия антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL [7].

Апоптоз — физиологическое явление, поэтому существуют специфические факторы, влияющие на уровень запрограммированной гибели клеток: физиологические активаторы и ингибиторы. К активаторам апоптоза следует отнести: недостаток факторов роста, потерю связи с матриксом, глюкокортикоиды, свободные радикалы, а также некоторые вирусы и ионизирующую радиацию [9].

Известно большое количество ингибиторов апоптоза как экзогенного, так и эндогенного происхождения. К ним, в частности, относятся липополисахариды грамотрицательных бактерий, вирусные белки, эстрогены, андрогены, нейтральные аминокислоты, ингибиторы протеаз, стимуляторы миелопоэза (G-CSF, GM-CSF), интерлейкины (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10), интерфероны, лейкотриены. Значимым в этом многообразии факторов является неоднозначность их влияния. В частности, один и тот же цитокин, гормон и регуляторное вещество может быть и ингибитором, и индуктором апоптоза. Это определяется типом клеток-мишеней, степенью их дифференцированности, а также

особенностями функционирования внутриклеточных механизмов. Так, например, IL-4 и IL-10 ингибируют апоптоз Т- и В-лимфоцитов и индуцируют апоптоз циркулирующих моноцитов [23].

Как известно, клеточный гомеостаз в организме поддерживается процессами пролиферации и гибели клеток. При этом апоптоз, который долгое время считался автономным процессом, не является индифферентным для окружающих клеток. Апоптотические клетки могут генерировать разнообразные сигналы, которые оказывают глубокое влияние на соседние клетки и ткани [36]. В частности, определены неавтономные эффекты апоптоза в отношении соседних клеток, включающие влияние на пролиферацию, миграцию, морфологию, а также гибель клеток в окружающих тканях [16, 19, 24]. Кроме того, механическое воздействие — изменение напряжения и ремоделирования в прилегающих тканях также относят к неавтономным эффектам апоптоза [38].

К сигналам, которые генерируют апоптотические клетки, относятся многие факторы. Так, при распаде клеточных структур на отдельные фрагменты, в конечном итоге, процессов апоптоза и почкования плазматической мембраны образуются апоптотические тельца. Апоптотические тельца, наряду с экзосомами и эктосомами, относят к числу микровезикул, выполняющих значимую роль в транспортировке различных белков, мРНК и микроРНК в клетке [19]. Показано, что микровезикулы играют важную роль в патофизиологии РА: в экспериментальной модели РА было установлено, что они способны индуцировать в Т-клетках резистентность к апоптозу. Известно также, что, наряду с увеличением концентрации фосфатидилсерина во внешнем монослое цитоплазматической мембраны, образование микровезикул повышается на ранней стадии апоптоза, в то время как апоптотические тельца, в отличие от микровезикул, являющихся более крупными частицами (более 1,5 мкм), образуются вследствие фрагментации клетки на финальной стадии апоптоза. Кроме того, в микровезикулах обнаружена высокая концентрация ключевого фермента апоптоза — каспазы-3. Предполагается, что клетка избегает гибели, с помощью микровезикул избавляясь от фермента, поскольку ингибирование фермента приводит к блокаде их высвобождения [4].

Нарушение регуляции микроРНК в мононуклеарных клетках периферической крови или Т-лимфоцитах синовиальной ткани и синовиальных фибробластов (FLS), способствует воспалению, деградации внеклеточного матрикса и инвазивному действию резидентных клеток [18]. Наиболее известные микроРНК, опосредо-

ванные с развитием РА — микроРНК-155 и микроРНК-146а. МикроРНК-155 усиливает свою активность в FLS больных РА, а ингибирование их в FLS приводит к снижению выработки TNF- α , в то время как избыточная экспрессия микроРНК-155 приводит к хроническому воспалительному состоянию с увеличением продукции провоспалительных цитокинов [39].

Гомеостатическое равновесие в организме поддерживается процессами пролиферации и гибели клеток. Выделяют 12 видов программируемой клеточной гибели. К основным и наиболее распространенным типам, помимо апоптоза, относят аутофагию и некроз. Среди дополнительных форм клеточной гибели известны: аноиксис, параптоз, пироптоз, пиронекроз, энтоз, некроптоз и др. [21].

Некроз, как форма гибели клеток, считается пассивным процессом, сопровождающийся разрушением мембраны клетки и высвобождением клеточного содержимого во внеклеточное пространство. Окружающие клетки в большинстве подвержены воздействию некротического материала, что ведет к возникновению воспалительной реакции и гибели соседних клеток.

Другой формой клеточной смерти является аутофагия, в процессе которой клетка переваривает свое содержимое: клеточные органеллы и макромолекулы. Аутофагия представляет собой механизм выживания и сопровождает жизнедеятельность любой нормальной клетки. Наиболее интересный, шапероновый тип аутофагии, который описан только для млекопитающих и индуцируется стрессом, происходит при участии цитоплазматических белков-шаперонов семейства hsp-70, вспомогательных белков и LAMP-2. При определенных обстоятельствах, таких как повреждение органелл или нехватка питательных веществ, процесс аутофагии приводит к гибели клетки и поглощению макрофагами оставшегося клеточного дебриса [5, 20, 31, 35, 40].

В связи с необходимостью своевременной элиминации разрушенных клеток важную роль в процессах апоптоза выполняет фагоцитарная система [34]. В основном, апоптотические клетки и апоптотические тельца поглощаются и перевариваются макрофагами, дендритными или эндотелиальными клетками. Предполагается, что часть апоптотических телец попадает в кровоток, где они способны циркулировать длительное время и влиять на жизнеспособность и дифференцировку соседних клеток.

Апоптоз, или запрограммированный клиренс клеток, — это строго регламентированный физиологический процесс уничтожения умирающих клеток, который происходит быстро и эффективно у здоровых организмов. Исходя из основ-

ных типов гибели клеток, в процессе каждого из них возможно образование молекул, способных влиять неавтономно на окружающие клетки. В частности, при апоптозе с помощью фрагментированной ДНК, экстернализованного фосфатидилсерина, активированных каспаз на фоне отсутствия воспалительной реакции. При аутофагии — с помощью крупных вакуолей и способностью клеток восстанавливаться на очень поздних стадиях процесса. Некроз же связан с неконтролируемым высвобождением внутриклеточного содержимого клетки, сопровождающимся отеком и разрывом мембраны, обычно вызывающим воспалительный ответ [43].

Таким образом, процессы разрушения клеток связаны с появлением многих вариантов сохранения их жизнеспособности и возможности проявления неавтономных эффектов, обусловленных экспрессией внутриклеточных активных молекул, изменением межклеточного взаимодействия, а также эффективностью работы элиминационной системы. Предваряя исследование механизмов неавтономных эффектов апоптоза, в данной работе мы определяли возможность и особенности процессов активации и пролиферации Т-лимфоцитов в условиях индукции апоптоза *in vitro* у здоровых людей и пациентов с РА.

Целью настоящего исследования являлось определение экспрессии маркеров активации и пролиферации на Т-лимфоцитах в процессе инициации апоптотической гибели клеток в условиях «клеточного соседства» у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом.

Материалы и методы

Объектом исследования являлась периферическая кровь 6 условно здоровых женщин, не имеющих аутоиммунных, острых и обострения хронических заболеваний, средний возраст группы составил $51,0 \pm 6,5$, а также периферическая кровь 6 женщин больных РА (средний возраст $57,8 \pm 3,3$ лет), находившихся на лечении в клинике ФГБНУ НИИФКИ г. Новосибирска. Верификация диагноза и набор пациентов в группы исследования осуществлялся в отделении ревматологии Клиники «НИИФКИ». Постановка диагноза ревматоидного артрита была выполнена согласно приказу № 21 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом» от 13 января 2006 г. Соответствие принципам этики: протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом при НИИФКИ (выписка из протокола № 107 от 15 июня 2018 года). В соответствии с этическими стандартами участники исследования подписывали информированное согласие.

Выделенная на градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,078) (BioClot GmbH, Германия) лимфоцитарная фракция клеток была распределена на 2 варианта культуры (Приложение 1). Первый вариант («нормально пролиферирующая CFSE⁺ культура» (НП)) – 7 лунок по $5,0 \times 10^5$ кл/0,5 мл полной культуральной среды (ПКС), окрашенных флуоресцентным красителем CFSE (4 мкМ, Molecular probes, США), (CFSE⁺). В составе ПКС – среда RPMI-1640 (ООО «Биолот», Санкт-Петербург), тиенам, (ЗАО ОПТАТ, Россия), L-глутамин (Gerbu, Biotechnik, GmbH, Германия), буферный раствор Нерес (GERBU, Biotechnik, GmbH), фетальная телячья сыворотка (FCS), (Hy Clone, США). Второй вариант – «апоптотическая CFSE⁻ культура» (АК) – 3 лунки (нестимулированные клетки, aCD3⁻ (1 мкг/мл, МедБиоСпектр, Москва), и дексаметазон-стимулированные (1×10^{-4} М) клетки) по 2×10^6 кл/150,0 мкл обедненной (1% FCS) ОС среды (CFSE⁻). На 4-е сутки инкубации в термостате (37 °С, 5% CO₂) апоптотическая культура (клетки и супернатант отдельно) была перенесена к лимфоцитам, пролиферирующим в условиях ПКС. Далее проводилось сокультивирование проб, получивших условные названия (Приложение 2): 1 – «Контроль» – контрольное культивирование лимфоцитов в ПКС; 2 – «Контроль апоптоза» – к НП лимфоцитам была добавлена клеточная часть нестимулированных клеток АК; 3 – «Контроль апоптоза супернатант» – сокультивирование НП в ПКС и перенесенного к ней супернатанта от нестимулированной АК; 4 – «aCD3» – НП культура и клетки АК, стимулированные aCD3; 5 – «aCD3 супернатант» – НП лимфоциты и супернатант от АК, стимулированной aCD3; 6 – Деха – сокультивирование НП лимфоцитов в ПКС и АК, обработанной дексаметазоном (1×10^{-4} М); 7 – Деха супернатант – НП лимфоциты и супернатант от АК, обработанной дексаметазоном. На 7-е сутки на цитофлуориметре BD FACS Canto II в популяции Т-лимфоцитов (CD3⁺/CD4⁺; CD3⁺/CD4⁺) с помощью набора с Аннексином V (AnV), меченным PE и интеркалирующим красителем 7AAD (Becton Dickinson, США) определялся уровень раннего (AnV⁺/7AAD⁻, %) и позднего (AnV⁺/7AAD⁺, %) апоптоза в нативных, а также в контрольных, aCD3⁻ и дексаметазон-стимулированных вариантах. Для выявления популяции живых клеток на предварительном этапе по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния отделяли клеточный дебрис и клетки, находящиеся на стадии позднего некроза. В областях гистограмм, представленных живыми и находящимися в инициальных фазах апоптоза лимфоцитами, в каждой пробе устанавливалась категория

(AnV⁻/7AAD⁻) живых клеток [10]. Определение содержания клеток, несущих маркеры активации проводилось на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с предварительным мечением Т-лимфоцитов антителами с различными спектрами эмиссии: CD3PE/Cy7; CD4/APC/Cy7; CD25/PE/Cy5; CD 69/PE (все антитела были производства BioLegend, США). Для определения позитивных по маркерам активации клеток использовали соответствующие FMO (Fluorescence minus one)-контроли.

Окрашивание клеток по маркеру пролиферации Ki-67 проводили по протоколу оценки внутриклеточных молекул методом проточной цитометрии. После мечения антителами к поверхностным маркерам клетки фиксировали и пермиабилizировали, используя набор Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Cytofix/CytopermTM, США), затем окрашивали антителами к Ki-67, конъюгированных с APC (BioLegend, США). В качестве контроля использовали Т-клетки, культивированные без стимуляции. Запись проб и анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения FACS Diva 6.1 (Becton Dickinson, США).

Статистическая обработка данных проводилась с применением методов непараметрической статистики в программе Statistica 6.0 (StatSoft, США). В анализе были использованы U-критерий Манна–Уитни, парный критерий Вилкоксона и ранговая корреляция по методу Спирмена. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), возраст представлен в виде M±m. Различия между группами считались статистически значимыми при достигнутом уровне $p \leq 0,05$.

Результаты

Для выявления функционального состояния Т-лимфоцитов, находящихся в процессе совместного культивирования в условиях «клеточного соседства» «апоптотирующих» и «нормально пролиферирующих» клеток, нами были проведены исследования параметров экспрессии наиболее ранних и более поздних маркеров активации (CD69⁺, CD25⁺ соответственно) и пролиферации (Ki-67) у пациентов с РА и здоровых людей. На данном этапе исследования проводились в CFSE⁺ культуре в процессе совместного культивирования клеток через 24, 48 и 72 часа после переноса CFSE⁻ апоптотирующих клеток и супернатантов этих апоптотических культур к аутологичным CFSE⁺ лимфоцитам, находящимся в физиологических условиях культивирования.

В процессе анализа было установлено изменение содержания CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, экспрессирующих активационные маркеры во всех исследуемых пробах, кроме пробы Деха у пациентов с РА. Полученные результаты свидетельствовали о преимущественном снижении числа клеток, экспрессирующих CD69⁺ (наиболее ранний маркер активации) и CD25⁺/CD69⁺

через 48 часов сокультивирования. А также о преимущественном повышении популяций лимфоцитов, экспрессирующих CD25⁺ и, в меньшей степени, CD25⁺/CD69⁺ и уменьшении CD25⁻/CD69⁻ через 48 и 72 часа сокультивирования в нестимулированных (табл. 1) и стимулированных аCD3 и дексаметазоном (табл. 2) CFSE⁺ культурах у больных с РА.

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ В НЕСТИМУЛИРОВАННОЙ, CFSE⁺ КУЛЬТУРЕ В ПРОЦЕССЕ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ КЛЕТОЧНЫМИ И ГУМОРАЛЬНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ АУТОЛОГИЧНОЙ АПОПТОТИЧЕСКОЙ (CFSE⁻) КУЛЬТУРЫ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

TABLE 1. DYNAMICS OF ACTIVATION MARKERS EXPRESSION ON UNSTIMULATED, CFSE⁺ CULTURE DURING THE INDUCTION OF T LYMPHOCYTE APOPTOSIS BY THE CELLULAR AND HUMORAL COMPONENTS OF AN AUTOLOGOUS APOPTOTIC (CFSE⁻) CULTURE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

CFSE ⁺	24 часа (1) 24 hours (1)	48 часов (2) 48 hours (2)	72 часа (3) 72 hours (3)	p
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (К) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (C)	0,4 (0,1-1,4)	1,05 (0,2-2,2)	1,1 (0,1-1,5)	0,059 ⁽²⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (КА) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (CA)	2,4 (1,5-7,7)	1,55 (0,5-3,5)	2,5 (1,0-4,3)	0,043 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁻ /CD25 ⁻ (КА) CD8 ⁺ /CD69 ⁻ /CD25 ⁻ (CA)	96,05 (90,4-98,3)	96,85 (92,2-99,0)	95,8 (95,5-98,7)	0,028 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (КА супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (CA super.)	2,5 (1,3-3,5)	1,45 (0,7-1,8)	2,2 (0,2-1,2)	0,043 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁻ /CD25 ⁺ (КА супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁻ /CD25 ⁺ (CA super.)	0,85 (0,3-2,1)	0,4 (0,2-2,5)	0,5 (0,2-1,2)	0,06 ⁽¹⁻²⁾
CD4 ⁺ /Ki 67 ⁺ (КА супер.) CD4 ⁺ /Ki 67 ⁺ (CA super.)	0,6 (0,5-0,7)	1,2 (0,7-2,1)	0,9 (0,3-0,9)	0,043 ⁽¹⁻²⁾ 0,07 ⁽²⁻³⁾

Примечание. n = 6; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}); единицы измерения – %, за 100% принято число CD4⁺ или CD8⁺Т-лимфоцитов (не менее 10000 событий).

Note. n = 6; measure units – %, the number of CD4⁺ or CD8⁺T lymphocytes was taken as 100% (no less than 10000 events); (C), control; (CA), control of apoptosis with cell transfer; (CA super.), control of apoptosis with supernatant transfer.

В частности, в пробах контроль апоптоза «КА» и контроль апоптоза супернатант «КА супер.» количество CD8⁺/CD69⁺/CD25⁻ клеток достоверно снижается через двое суток инкубации. В то время как число клеток, несущих двойную экспрессию активационных маркеров CD8⁺/CD69⁺/CD25⁺ в пробе «К», имеет тенденцию к повышению через 72 часа,

содержание неактивированных CD8⁺/CD25⁻/CD69⁻ клеток в пробе «КА» через двое суток соответственно и достоверно возрастает. Следует отметить, что в пробе контроль апоптоза супернатант «КА супер.» в популяции CD4⁺ лимфоцитов значительно увеличилось содержание клеток, экспрессирующих маркер пролиферации Ki-67 через 48 часов инкубации.

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ В aCD3- И Деха-СТИМУЛИРОВАННЫХ, CFSE+ КУЛЬТУРАХ В ПРОЦЕССЕ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ КЛЕТОЧНЫМИ И ГУМОРАЛЬНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ АУТОЛОГИЧНОЙ АПОПТОТИЧЕСКОЙ (CFSE-) КУЛЬТУРЫ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

TABLE 2. DYNAMICS OF ACTIVATION MARKERS EXPRESSION IN aCD3- AND Dexa-STIMULATED, CFSE+ CULTURES DURING THE INDUCTION OF T LYMPHOCYTE APOPTOSIS BY THE CELLULAR AND HUMORAL COMPONENTS OF AN AUTOLOGOUS APOPTOTIC (CFSE-) CULTURE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

CFSE+	24 часа (1) 24 hours (1)	48 часов (2) 48 hours (2)	72 часа (3) 72 hours (3)	p
CD4 ⁺ /Ki 67 ⁺ (aCD3)	1,6 (1,2-2,1)	5,9 (1,8-6,7)	3,1 (0,7-6,2)	0,046 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3)	7,65 (3,2-10,4)	8,2 (4,3-30,5)	23,8 (7,2-52,6)	0,043 ⁽¹⁻³⁾ 0,043 ⁽²⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3)	17,75 (9,5-55,9)	19,1 (5,2-26,5)	6,0 (3,2-17,2)	0,043 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (aCD3)	16,2 (10,0-26,7)	10,55 (6,7-19,9)	8,4 (4,2-10,8)	0,028 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ Ki 67 ⁺ (aCD3)	1,3 (1,2-1,4)	2,75 (0,6-5,8)	2,5 (1,8-3,4)	0,079 ⁽¹⁻³⁾
CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	6,75 (4,9-8,0)	11,75 (6,1-32,5)	25,4 (11,7-56,7)	0,043 ⁽¹⁻³⁾ 0,043 ⁽²⁻³⁾
CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	21,1 (6,7-60,0)	12,15 (7,0-34,0)	9,4 (5,9-14,0)	0,043 ⁽²⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	5,05 (1,5-8,6)	8,3 (3,6-40,2)	24,2 (7,0-52,0)	0,043 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	15,65 (5,4-50,2)	12,3 (3,9-15,9)	10,3 (3,6-15,7)	0,043 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (aCD3 супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (aCD3 super.)	13,35 (8,2-23,5)	8,4 (4,6-13,2)	7,6 (5,9-10,6)	0,028 ⁽¹⁻²⁾ 0,07 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (Деха супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (Dexa super.)	1,2 (1,1-2,7)	0,9 (0,2-1,3)	1,6 (1,0-1,7)	0,028 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ /Ki 67 (Деха супер.) CD8 ⁺ /Ki 67 (Dexa super.)	0,25 (0,2-0,3)	0,4 (0,2-0,5)	0,4 (0,3-0,7)	0,079 ⁽¹⁻²⁾ 0,067 ⁽¹⁻³⁾

Примечание. n = 6; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}); единицы измерения – %, за 100% принято число CD4⁺ или CD8⁺Т-лимфоцитов (не менее 10000 событий).

Note. n = 6; measure units – %, the number of CD4⁺ or CD8⁺T lymphocytes was taken as 100% (no less than 10000 events); (aCD3 super.), cells with aCD3 supernatant transfer; (Dexa super.), cells with dexamethasone supernatant transfer.

Самое значительное изменение активационных маркеров было выявлено в пробах больных РА, стимулированных aCD3, при этом сохранялись закономерности, установленные при исследовании нестимулированных проб. Так, в CD4⁺ лимфоцитах, несущих двойную экспрессию активационных маркеров (25⁺/69⁺), было определено снижение между 48 и 72 часами инкубации, при этом параметры на 24 часа также достоверно отличались от показателей на 72 часа, как в популяции CD4⁺, так и CD8⁺ клеток. В CD4⁺ лим-

фоцитах в «aCD3» пробе к 48 часам инкубации значительно увеличилось число клеток, экспрессирующих маркер пролиферации Ki-67, тогда как в популяции CD8⁺ количество Ki-67⁺ клеток повышалось к 72 часам только на уровне тенденции.

В популяции CD8⁺ клеток, стимулированных «aCD3» и в CD4⁺ лимфоцитах, стимулированных супернатантом от этой пробы, достоверно увеличилось количество CD25⁺ клеток к 48 и 72 часам. При этом в пробах «aCD3 супер.» в популяции CD8⁺Т-лимфоцитов значительно уменьшается

число CD25⁺/CD69⁺ и CD69⁺ клеток. Кроме того, сходные со стимулированной aCD3 клеточной фракцией закономерности экспрессии активационных маркеров на CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитах были выявлены также в пробах, стимулированных супернатантом от данной культуры, но тем не менее значимых изменений маркера пролиферации Ki-67 в этих пробах установлено не было. Не было определено также достоверных изменений активационных маркеров и маркеров пролиферации в динамике совместного культивирования CFSE⁺ и CFSE⁻ культур при переносе клеток, активированных дексаметазоном. В то же время перенос

супернатантов данной культуры к аутологичным клеткам, находящимся в полной культуральной среде привел к снижению содержания CD8⁺/CD69⁺ клеток к 48 часам инкубации по сравнению с 24 часами, а также к достоверному увеличению CD8⁺/Ki-67⁺ через 48 и значимой тенденции к повышению через 72 часа инкубации.

Аналогичный анализ, проведенный в группе здоровых людей, выявил динамику в содержании клеток, экспрессирующих маркеры активации в процессе 24-, 48- и 72-часового совместного культивирования CFSE⁺ и CFSE⁻ культур только в стимулированных пробах (табл. 3).

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ В aCD3- И ДЕКСА-СТИМУЛИРОВАННЫХ, CFSE⁺ КУЛЬТУРАХ В ПРОЦЕССЕ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ КЛЕТЧНЫМИ И ГУМОРАЛЬНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ АУТОЛОГИЧНОЙ АПОПТОТИЧЕСКОЙ (CFSE⁻) КУЛЬТУРЫ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

TABLE 3. DYNAMICS OF ACTIVATION MARKERS EXPRESSION IN aCD3- AND Dexa-STIMULATED, CFSE⁺ CULTURES DURING THE INDUCTION OF T LYMPHOCYTE APOPTOSIS BY THE CELLULAR AND HUMORAL COMPONENTS OF AN AUTOLOGOUS APOPTOTIC (CFSE⁻) CULTURE IN HEALTHY PEOPLE

CFSE ⁺	24 часа (1) 24 hours (1)	48 часов (2) 48 hours (2)	72 часа (3) 72 hours (3)	p
CD4 ⁺ /CD25 ⁺ /CD69 ⁺ (aCD3)	32,5 (11,9-34,5)	22,2 (18,6-27,3)	14,5 (4,2-19,8)	0,043 ⁽¹⁻³⁾ 0,043 ⁽²⁻³⁾
CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3)	19,3 (17,3-22,8)	20,1 (9,8-20,2)	5,6 (3,8-14,6)	0,043 ⁽¹⁻³⁾ 0,043 ⁽²⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3)	2,1 (2,0-3,3)	5,9 (5,6-6,1)	11,6 (3,8-30,6)	0,043 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3)	17,5 (16,0-28,6)	17,9 (4,9-19,8)	8,3 (1,3-11,4)	0,043 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3)	23,6 (21,2-31,4)	20,4 (15,7-23,5)	8,6 (7,3-11,6)	0,043 ⁽¹⁻³⁾ 0,043 ⁽²⁻³⁾
CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	6,0 (3,7-6,9)	6,0 (5,6-29,5)	17,1 (11,0-47,7)	0,043 ⁽²⁻³⁾
CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	17,1 (10,7-18,7)	9,2 (9,0-18,5)	5,6 (4,8-14,7)	0,043 ⁽²⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	0,6 (0,6-7,4)	2,5 (1,4-6,1)	13,7 (6,4-9,4)	0,043 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	18,9 (17,3-24,9)	16,6 (13,7-17,5)	9,1 (7,8-15,7)	0,043 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (Деха супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (Dexa super.)	0,4 (0,2-0,7)	0,2 (0,2-0,5)	1,0 (0,8-2,3)	0,043 ⁽²⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (Деха супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (Dexa super.)	97,5 (97,4-97,6)	97,7 (97,5-98,5)	96,5 (96,2-97,9)	0,043 ⁽¹⁻²⁾ 0,043 ⁽²⁻³⁾

Примечание. n = 6; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}); единицы измерения – %, за 100% принято число CD4⁺ или CD8⁺Т-лимфоцитов (не менее 10000 событий).

Note. n = 6; measure units – %, the number of CD4⁺ or CD8⁺T lymphocytes was taken as 100% (no less than 10000 events); (aCD3 super.), cells with aCD3 supernatant transfer; (Dexa super.), cells with dexamethasone supernatant transfer.

Так, у здоровых людей после переноса апоптотической CFSE⁻ культуры, активированной aCD3 к аутологичным CFSE⁺ клеткам, пролиферирующим в полной культуральной среде, произошло повышение содержания CD25⁺ Т-лимфоцитов, как в популяции CD4⁺, так и СВ8⁺ клеток. При этом указанное повышение произошло не только при культивировании с апоптотическими клетками (пробы «aCD3»), но и при добавлении супернатантов от этих клеток (пробы «aCD3 супер.»). Аналогичные изменения характерны и для экспрессии наиболее раннего маркера активации – CD69⁺, но, в отличие от CD25⁺, при этом произошло снижение его содержания к 48 и 72 часам инкубации. Также произошло снижение количества клеток, несущих двойную экспрессию активационных маркеров (69⁺/25⁺) к 72 часам, как среди CD4⁺, так и CD8⁺Т-лимфоцитов. Следует отметить, что у здоровых людей, также как у пациентов с РА, не было определено значимых изменений в экспрессии активационных маркеров в CFSE⁺ культуре после переноса CFSE⁻ клеток, активированных дексаметазоном (проба Деха), но указанные изменения проявились при переносе супернатанта от этой культуры (проба «Деха супер.»). При этом повышалось число CD25⁺ клеток к 72 часам инкубирования и содержание отрицательных по обоим маркерам активации к 48 часам сокультивирования.

Главным отличием экспрессии маркеров на Т-лимфоцитах пациентов с РА и здоровых людей в динамике 3-дневной инкубации в условиях «клеточного соседства» апоптотизирующей и пролиферирующей культуры является отсутствие значимых изменений экспрессии маркера пролиферации Ki-67 у здоровых людей. Кроме того, у доноров динамика изменений в процессе инкубации была определена только после дополнительной стимуляции клеток aCD3 и дексаметазоном, в нестимулированной культуре достоверных изменений не произошло.

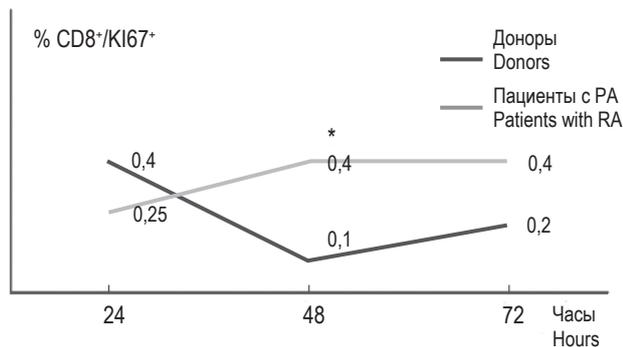
В процессе дальнейшего анализа устанавливался характер изменений проб лимфоцитов в CFSE⁺ культуре в зависимости от времени инкубации с аутологичной CFSE⁻ культурой. Так, у пациентов с РА медиана CD4⁺/CD25⁺/CD69⁻ стала значимо выше после 72 часов инкубации, относительно 24 часов в пробе «aCD3 супер.» $25,4 \pm (11,7 \div 56,7)$ и $6,75 \pm (4,9 \div 8,0)$, соответственно, $p = 0,05$, и значительно понизилась для этой клеточной популяции через 72 часа в пробе «Деха супер.» $2,5 \pm (1,4 \div 3,2)$ и $5,07 \pm (4,0 \div 6,9)$, соответственно, $p = 0,045$. При этом процент Ki-67⁺ лимфоцитов в популяции CD8⁺ в пробе «Деха супер.» был значимо более высок через 72 часа инкубации $0,25 \pm (0,2 \div 0,3)$ и $0,4 \pm (0,3 \div 0,7)$, $p = 0,035$, а медиана Ki-67⁺ клеток среди CD4⁺ лимфоцитов

в пробе aCD3 была достоверно выше через 48 часов инкубации $1,5 \pm (1,2 \div 2,1)$ и $5,9 \pm (1,8 \div 6,7)$ соответственно, $p = 0,05$. Таким образом, в процессе культивирования у пациентов с РА закономерно изменяется количество клеток, экспрессирующих активационные маркеры и повышается число клеток, несущих маркер пролиферации.

Аналогичный анализ культур здоровых людей выявил изменения в экспрессии активационных маркеров в пробах, активированных aCD3. Так, в CFSE⁺ популяции CD4⁺ лимфоцитов, стимулированных антителами к CD3, были выявлены более высокие параметры клеток, экспрессирующих CD25 через 48 часов инкубации с CFSE⁻ культурой – $5,1 \pm (4,6 \div 5,2)$ и $9,7 \pm (8,7 \div 21,6)$ соответственно, $p = 0,021$. При этом в популяции CD8⁺ лимфоцитов, стимулированных aCD3, к 72 часам инкубации $8,6 \pm (7,3 \div 11,6)$ значимо снизилось содержание клеток, несущих ранний маркер активации CD69, как относительно 24 часов $23,6 \pm (21,2 \div 31,4)$, $p = 0,012$, так и относительно 48 часов $20,4 \pm (15,7 \div 23,5)$, $p = 0,036$. Указанные изменения у здоровых людей не сопровождались увеличением экспрессии маркера пролиферации Ki-67.

Помимо анализа динамики активационных и пролиферативных маркеров в культурах доноров и пациентов с РА был проведен сравнительный анализ экспрессии указанных маркеров между группами больных и здоровых людей. Сравнительный анализ между группами пациентов с РА и здоровыми людьми по количеству Т-лимфоцитов, экспрессирующих активационные маркеры в зависимости от времени инкубации, выявил более высокие показатели в культурах здоровых людей. Так, через 48 часов в пробе «КА» содержание CD4⁺/CD25⁺/CD69⁻ лимфоцитов у здоровых людей составило $7,1 \pm (6,7 \div 7,6)$, а у пациентов – $4,4 \pm (3,7 \div 4,9)$, $p = 0,008$, а в пробе «aCD3» содержание CD8⁺/CD25⁺/CD69⁺ у здоровых людей равнялось $20,4 \pm (15,7 \div 23,5)$, в то время как у больных РА $10,6 \pm (6,7 \div 19,9)$, $p = 0,05$. Аналогичные закономерности были установлены и через 72 часа сокультивирования, в частности в пробе «КА» содержание CD4⁺/CD25⁺/CD69⁻ лимфоцитов составило $9,9 \pm (6,9 \div 11,3)$ и $3,2 \pm (3,1 \div 3,9)$, $p = 0,012$, а в пробе «Деха супер.» эта же клеточная популяция составила $8,3 \pm (4,1 \div 9,3)$ и $2,5 \pm (1,4 \div 3,2)$, $p = 0,021$ соответственно. В то же время содержание клеток, несущих маркер пролиферации Ki-67, было значимо выше в культуре пациентов с РА. При этом, если через 24 часа в пробах «К» и «КА супер.» на уровне выраженной тенденции, то через 48 часов достоверно в популяции CD8⁺ (рис. 1А), а через 72 часа среди CD4⁺ лимфоцитов в пробе «Деха супер.» (рис. 1Б).

А (A)



Б (B)

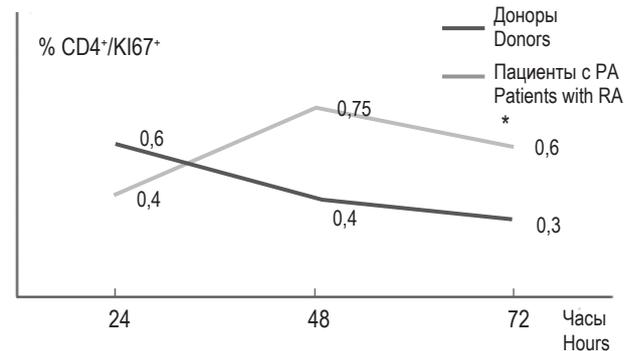


Рисунок 1. Содержание Ki-67⁺ лимфоцитов в культурах после переноса супернатанта от Деха-стимулированных индуцированных в апоптоз клеток

Примечание. А – CD8⁺ клетки. Б – CD4⁺ клетки. n = 12, единицы измерения – %; 24, 48, 72 часа – время инкубации; * – p ≤ 0,05.

Figure 1. Proportion of Ki-67⁺ lymphocytes in cultures after transfer of supernatant of Dexa-stimulated apoptosis-induced cells

Note. A – CD8⁺ cells. B – CD4⁺ cells. n = 12; measure units – %; 24, 48, 72 hours – time of incubation; *, p ≤ 0.05.

Обсуждение

Проведенное исследование является закономерным продолжением нашей работы, посвященной изучению процессов апоптоза при РА. Исходно основанием для исследования послужили данные о нарушении программированной гибели мононуклеарных клеток периферической крови, приводящие к формированию аутоиммунного воспаления у пациентов с ревматоидным артритом вследствие нарушения процесса выбраковки аутоспецифичных клонов лимфоцитов [1, 8].

Как известно, синовиальные клетки больных РА состоят из двух функционально отличимых субпопуляций: пролиферирующие и апоптотические клетки [2]. Нами была разработана модель, по нашему мнению, наиболее приближенная к процессам, происходящим в суставах, – совместное культивирование Т-лимфоцитов, предварительно подвергнутых наиболее физиологичному варианту активационного апоптоза (инкубации в условиях скученности и обеднения культуральной среды) и аутологичных клеток, пролиферирующих в полной культуральной среде. В дальнейшем наша модель стала именоваться «клеточное соседство» (название было позаимствовано из публикации Kawamoto Y. и соавт.) [24].

Созданию модели способствовала возможность изучения функций «апоптотирующих» и «пролиферирующих» аутологичных клеток в одной культуре в процессе сокультивирования, поскольку «вторично-индуцированные» в апоптоз клетки были предварительно окрашены флуоресцентным красителем CFSE (CFSE⁻ и CFSE⁺

культуры, соответственно). Применение указанной модели позволило выявить некоторые новые закономерности. Поскольку полученные в данном исследовании результаты являются логическим продолжением начатой работы, мы сочли возможным вернуться к общим положениям опубликованных ранее данных. Во-первых, ранее была установлена возможность вторичной индукции раннего и позднего апоптоза клеток с помощью гуморальных и клеточных компонентов аутологичной культуры, подвергнутой активационному апоптозу. Определены особенности апоптоза в не стимулированных, а также aCD3- и дексаметазон-стимулированных культурах относительно контролей в группах здоровых и больных людей. При этом не было выявлено значимых различий по параметрам апоптоза во всех исследуемых вариантах культур между пациентами с РА и здоровыми людьми аналогичного пола и возраста. Тем не менее качественный анализ динамики процессов активационного апоптоза Т-лимфоцитов в группах здоровых людей и пациентов с РА свидетельствовал о существовании групповых особенностей в характере ответа на неблагоприятные условия, дополнительную активацию aCD3 пролиферативными стимулами и влияние высоких доз дексаметазона. Учитывая важную роль пролиферации в поддержании клеточного гомеостаза, мы проанализировали соотношение апоптотирующих и живых клеток в исследуемых культурах доноров и пациентов с РА. В результате было установлено значимое повышение живых клеток в CFSE⁻ культуре больных РА относительно доноров.

Полученные результаты свидетельствовали о необходимости изучения функционального состояния первично- и вторично- индуцированных в апоптоз Т-лимфоцитов. Поэтому на данном этапе работы мы определяли экспрессию маркеров активации (CD69⁺, CD25⁺) и пролиферации (Ki-67) CFSE⁺ Т-лимфоцитов, находящихся *in vitro* в условиях «клеточного соседства» с CFSE⁻ клетками, у пациентов с РА и здоровых людей.

В наших экспериментах была использована возможность раздельного переноса апоптотирующих клеток и супернатантов от этих культур к аутологичным лимфоцитам с целью предварительной дифференциации клеточных (контактных) и гуморальных (растворимых) факторов, вызывающих возможные неавтономные эффекты в процессе индукции апоптоза. Кроме того, мы применяли 2 варианта контролей — проба «К» — клетки, находившиеся в течение 7 дней в ПКС (на 4 сутки объем пробы доводился до 1 мл ПКС) и проба «КА», в которой к «нормально пролиферирующим» клеткам переносились клетки и супернатант от не стимулированной «апоптотической» культуры. Были также использованы клетки и супернатанты от проб, стимулированных aCD3 и дексаметазоном. В процессе подготовки экспериментов был проведен подбор оптимальной дозы дексаметазона, вызывающей апоптоз.

В научной литературе активация Т-лимфоцитов активно обсуждается с позиций физиологической и иммунопатологической модуляции активности иммунного ответа. На основании исследований *in vitro* в настоящее время маркеры активации Т-лимфоцитов классифицированы как очень ранние (CD69), ранние (CD25) и поздние (HLA-DR) в зависимости от времени их экспрессии после активации [32] CD69 (другие названия — activation inducer molecule, AIM; early activation antigen, EA-1) — трансмембранный белок типа I. Этот белок вовлечен в ранние механизмы активации Т-клеток, NK-, В-клеток, моноцитов и тромбоцитов. CD69 экспрессируется в повышенных количествах на Т-клетках из воспалительных инфильтратов при ревматоидном артрите, вирусных гепатитах, аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы.

Поскольку известно, что CD69 не экспрессируется на покоящихся лимфоцитах периферической крови, появляясь в течение 3 часов после антигенной стимуляции и достигая максимальной экспрессии между 18 и 24 часами [42], первой фиксированной точкой определения экспрессии активационных маркеров мы выбрали 24 часа от начала сокультивирования CFSE⁻ и CFSE⁺ культур. В процессе анализа было установлено преимущественное снижение числа Т-

лимфоцитов, экспрессирующих CD69⁺ и клеток с двойной экспрессией — CD25⁺/CD69⁺ через 48 часов со культивирования. Полученная закономерность проявилась изменением содержания CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, экспрессирующих активационные маркеры во всех исследуемых пробах при переносе и клеток, и супернатантов от этих культур, кроме пробы Dexa, как у здоровых людей, так и пациентов с РА. Как правило, в крови здоровых лиц обнаруживается не более чем 1-4% CD4⁺CD69⁺Т-клеток [42], В наших исследованиях экспрессия CD69 на Т-лимфоцитах, пролиферирующих в ПКС, после переноса к ним апоптотирующих клеток и супернатантов от этих культур превышала указанные показатели, в частности, в пробах, стимулированных aCD3.

Как известно, пролиферация и апоптоз взаимосвязаны — наиболее интенсивно апоптоз реализуется в процессе дифференцировки лимфоцитов. Покоящиеся зрелые клетки апоптозу не подвержены, они становятся чувствительными к индукции апоптоза после активации [3]. В связи с этим, наиболее интересным результатом при определении экспрессии маркеров активации в апоптотической культуре является выявленная нами динамика активационных маркеров в нестимулированных культурах у пациентов с РА, что является косвенным подтверждением хронической воспалительной активации Т-лимфоцитов у пациентов [44]. Экспрессия указанных маркеров у здоровых людей была выявлена только после дополнительной стимуляции антителами к CD3 и дексаметазоном.

Молекула CD25 — α-цепь рецептора к IL-2. Повышение количества CD25⁺-лимфоцитов свидетельствует о воспалительном процессе любой этиологии, в том числе и аутоиммунной [45]. В работе [6] в ПК здоровых доноров количество CD4⁺Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей мембране активационную молекулу CD25, составило 3,19±0,5%. У пациентов с РА — 1,6±0,3% (p < 0,05) Авторы связывают это понижение с истощением популяции при хроническом воспалении и постоянной активацией иммунной системы. В экспериментальной модели повреждения печени было показано, что содержание CD69⁺ снижается, а количество CD25⁺ лимфоцитов повышается в течение 3-6-12 часов после стимуляции повреждающим фактором — Con-A [22]. А в работе Motamedi M. и соавт. была определена кинетика указанных маркеров активации — повышение к 24 часам и снижение к 72 инкубации [33].

В наших исследованиях в группах здоровых людей и пациентов с РА значимое снижение числа «НП» CFSE⁺ клеток, несущих молекулу CD69, происходило преимущественно через 48 часов, а число лимфоцитов, экспрессирующих молекулу

CD25, повышалось через 48 и 72 часа после переноса к ним CFSE⁻ клеток, подвергнутых апоптозу. При этом перенос супернатанта от CFSE⁻ культур, стимулированных дексаметазоном, выявил более низкие параметры медианы CD4⁺/CD69⁺ к 72 часам совместного культивирования относительно 24 часов.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что, во-первых, не только непосредственный контакт с апоптотизирующими клетками вызывает повышение экспрессии маркеров активации с дальнейшим снижением уровней, динамика которых подтверждается в других исследованиях, но и, во-вторых, о том, что эффекторные молекулы, провоцирующие эти процессы, могут быть растворимыми. Результаты были получены, как в пробах больных, так и здоровых людей, у которых показатели активации были выше, чем у пациентов с РА, что в любом случае свидетельствует о неавтономных эффектах апоптоза, воспроизводимых в процессе со культивирования независимо от наличия или отсутствия аутоиммунного заболевания.

Использование в нашей работе дексаметазона — синтетического глюкокортикоида (ГС) — было обусловлено его значимой ролью в механизмах апоптоза. Апоптоз клеток, вызванный влиянием глюкокортикоидов, реализуется через митохондриальный путь [11]. Глюкокортикоиды действуют через внутриклеточный глюкокортикоидный рецептор (GR), который экспрессируется большинством ядродержащих клеток и способен вызывать широкий спектр эффектов через трансактивацию и трансрепрессию, регулируя экспрессию генов-мишеней. Помимо геномных механизмов, ГС также вызывают быстрые эффекты, опосредованные через клеточную мембрану, посредством регуляции сигнальных путей. ГС могут влиять как на врожденный, так и на адаптивный иммунитет [28].

В настоящее время установлено, что субпопуляции Т-лимфоцитов демонстрируют различную чувствительность к ГС [12].

Эффекты ГС на Т-лимфоциты включают индукцию апоптоза и подавление продукции цитокинов, участие в дифференцировке Т-хелперных (Th) клеток и влияние на структуру цитокинов, регулирующих дифференцировку подмножеств Т-клеток, а также подавление секреции цитокинов Th типа 2 Т-клетками человека [15].

Дексаметазон вмешивается не только в процессы апоптоза, но и в процессы аутофагии, в частности дексаметазон-индуцированная аутофагия защищает клетки мениска от дексаметазон-индуцированного апоптоза с помощью сигналов рецептора к инозитолтрифосфату [41].

Глюкокортикоиды влияют на различные подгруппы Т-клеток, вызывая, как правило, иммуносупрессивные эффекты,

В исследовании, посвященном изучению Т-клеток селезенки при лечении дексаметазоном в мышинной модели, было установлено зависимое от дозы снижение CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD44⁺ и CD8⁺/CD122⁺Т-клеток, но стимулирующее действие на CD4⁺/CD25⁺ регуляторные Т-клетки [15].

В экспериментальной работе *in vitro* лимфоциты периферической крови крупного рогатого скота (CD25^{hi}, CD25^{lo} и CD25⁻ WC1⁺ γδ Т-клетки) обрабатывались ГС в концентрациях, отражающих их уровни в плазме, достигнутые *in vivo*, от терапевтических доз (дексаметазон 1×10^{-7} М). Было установлено, что процентное содержание и абсолютное количество клеток CD25^{hi} WC1⁺ и CD25^{lo} WC1⁺ увеличивалось в присутствии дексаметазона. По мнению авторов, этот эффект был, по крайней мере частично, обусловлен более низкой смертностью этих клеток, чей апоптоз был подавлен воздействием дексаметазона [29].

На предыдущем этапе работы нами также было установлено увеличение числа живых Т-лимфоцитов у пациентов с РА в культурах, стимулированных дексаметазоном (1×10^{-4} М) и подвергнутых апоптозу. Мы склонились к выводу о другом, неавтономном механизме пролиферации, приводящему к увеличению живых клеток, поскольку уровень апоптоза в данных пробах у пациентов с РА не отличался от показателей аналогичных проб здоровых людей. В то же время в группе доноров количество живых клеток не увеличилось.

Отсутствие активирующего эффекта апоптотических клеток, стимулированных дексаметазоном (проба Деха) и вместе с тем выявленное влияние супернатанта от данной культуры (проба «Деха супернатант») является важным результатом, полученным после стимуляции апоптоза высокой дозой дексаметазона. Эти данные могут свидетельствовать об отсутствии контактного механизма активации и о наличии растворимых стимулирующих структур. Известно, что противоспалительный эффект дексаметазона обусловлен стимуляцией продукции IL-10 [28]. Возможно, именно этим обусловлено полученное нами снижение медианы стимулированных Деха CD4⁺/CD25⁺ лимфоцитов к 72 часам инкубации у пациентов с РА. В то же время в уже упоминаемой работе [29] процент клеток, продуцирующих IFN γ , увеличивался в присутствии дексаметазона, тогда как количество клеток, секретирующих ключевой противовоспалительный и иммуносупрессивный цитокин IL-10, снижалось. В любом случае, полученный результат позволяет сузить

дальнейший поиск эффекторных молекул иммунных дисфункций.

Ключевые различия между исследуемыми группами здоровых людей и пациентов с РА в проведенных экспериментах заключались в значимом повышении клеток, несущих маркер Ki-67 на Т-лимфоцитах пациентов с РА, экспрессия которого свидетельствует о запуске пролиферации. Известно, что цикл пролиферации клеток разделяют на две основные точки (checkpoints) S и M и две подготовительные точки – G1 и G2. Во время G1 и G2 фаз происходит синтез клеточных белков, необходимых для осуществления соответствующей фазы клеточного деления. S точка определяется как момент репликации ДНК, а в точке M полностью дублированные хромосомы разделяются в ядрах каждой из двух дочерних клеток во время митоза [13].

Активация Т-клеток представляет собой жестко регулируемый каскад событий, которые приводят к индукции цитокинов и экспрессии молекул активации, что в конечном итоге приводит к дивергентным иммунным ответам [33]. Молекула Ki-67 является универсальным маркером пролиферации, что обусловлено ее присутствием в клетке только во время процесса деления – она обнаруживается в ядрах клеток во все активные фазы клеточного цикла: G1, S, G2, M и разрушается в течение 1,5-2 часов после окончания митоза [33].

Поскольку Ki-67 является универсальным маркером для оценки пролиферативного потенциала, и прогноз пациентов может быть точно предсказан, данный маркер является сигнальной молекулой для диагностики, лечения и основой для прогноза исхода опухолей [30].

В работе [33] была оценена кинетика маркеров активации Т-клеток (CD4⁺ и CD8⁺), таких как CD25, CD38, CD69, CD71 и Ki-67, после стимуляции анти-CD3/CD28. Данные показали, что кинетика экспрессии этих маркеров следует точному и последовательному времени. Так, процент Т-клеток человека, экспрессирующих CD69 и CD25, при стимуляции достигал максимума в течение 24 часов и более высокий процент клеток, коэкспрессирующих CD71 и Ki-67, был очевиден для CD8⁺Т-клеток по сравнению с CD4⁺Т-клетками через 24 часа стимуляции. После 72 ч все протестированные маркеры активации оставались на максимальных уровнях, но процент клеток, экспрессирующих CD69, был значительно снижен в Т-лимфоцитах. В нашем исследовании CD8⁺Т-лимфоциты чаще отвечали на стимуляцию и экспрессировали маркер пролиферации. Возможно, это связано с преимущественно Th1 обусловленностью хронического воспалительно-

го процесса при РА, функциональным истощением данной клеточной популяции.

Полученные нами на данном этапе исследования результаты свидетельствуют о том, что выраженная в процессе индукции апоптоза экспрессия активационных маркеров на Т-лимфоцитах периферической крови здоровых людей, в отличие от пациентов с РА, не приводит к запуску процессов пролиферации. В свою очередь это может свидетельствовать о различиях в механизмах активации и о различных эффекторных молекулах, принимающих участие в автономных и неавтономных процессах апоптоза у здоровых людей и пациентов с РА. Неизвестный на данном этапе механизм неавтономного влияния апоптоза может лежать в основе избыточной пролиферации синовиоцитов, являющийся базисным проявлением патогенеза РА.

В связи с несомненной важностью изучения влияния апоптоза на особенности процессов восстановления клеточной популяции, мы приводим основные из известных на настоящее время механизмов его неавтономного влияния. Поскольку в предложенной нами модели не исключены другие варианты гибели клеток, мы обращаемся также к данным о влиянии аутофагии и некроза не только в «обсуждении», но и во «введении».

В настоящее время известно, что процессы апоптоза оказывают неавтономное воздействие на соседние клетки, включающее в себя влияние на пролиферацию, миграцию, морфологию, а также гибель клеток в окружающих тканях и морфогенетические изменения клеточного сообщества [19, 24].

По литературным данным, существует несколько ключевых механизмов, посредством которых апоптотирующие клетки могут неавтономно оказывать влияние на окружение: во-первых, механическое воздействие [16, 36].

Проведение экспериментов в условиях «клеточного соседства», при котором клетки крови (диффузной ткани) были подвергнуты апоптозу в условиях скученности и обеднения питательной среды, усиливающих межклеточный контакт и механическое давление, позволяет предположить возможным наличие данного механизма неавтономного влияния апоптоза. Данный вариант особенно возможен после трансплантации aCD3-стимулированных лимфоцитов, при котором происходит наиболее выраженная пролиферация. Логично также предположить, что увеличение числа живых клеток в CFSE⁻ культуре, в которой были созданы условия максимального механического давления, является закономерным. Механическое давление и апоптоз тесно связаны между собой в клеточном сообществе

служат морфогенетическим регулятором гомеостатического механизма. Предполагается, что указанное усиление давления индуцирует апоптотическую гибель клеток в культуре эпителиальных клеток млекопитающих посредством активации p53 [14]. В условиях полярно-дефицитной конкуренции клеток механическое напряжение активизирует регулятор цитоскелета ROCK, что приводит к повышению активности p53 через активацию p38 [14].

К клеточным, контактными механизмам неавтономного влияния апоптотирующих клеток можно отнести участие фосфатидилсерина. Известно, что экстернализация анионного фосфолипидного фосфатидилсерина (PS) контролируется фосфолипидными транслоказами и скрамблазами, а его экспозиция на апоптотических клетках является маркером раннего апоптоза. Вместе с тем появляются свидетельства того, что экспозиция PS происходит не только при других формах гибели клеток, включая некроз, но она также является важным сигналом «съешь меня» для фагоцитов и может действовать как сигнал «спаси меня», в частности во время регенерации аксонов [26].

Экспериментально доказано, что апоптоз-индуцированная пролиферация функционирует в качестве основы для регенерации органов. Несколько факторов, обнаруженных в этой экспериментальной системе, играют важную роль в регенерирующих процессах. Секреторные белки из апоптотических клеток запускают пролиферацию клеток и их соседей, и хотя эти белки отличаются между организмами, Wnt, Notch, FGF, TGF- β , и производство простагландина E2 (ПЭГ2), были идентифицированы в качестве кандидатов. В целом, эти сообщения поддерживают идею о том, что компенсационная пролиферация инициируется секреторными факторами из апоптотических клеток и усиливает значимость активного участия апоптоза в регенерации ткани [24]. В то же время тесная связь между пролиферацией и апоптозом может быть двунаправленной, и, действительно, апоптоз не автономно может индуцироваться пролиферирующими клетками. Одним из самых известных примеров является конкурентное клеточное взаимодействие, в котором медленно растущие клетки устраняются быстро растущими клетками [24].

Недавние исследования показали, что каспазы, известные своей ролью в апоптозе, помимо летальных функций, также обладают митогенными функциями. Каспазы могут способствовать пролиферации посредством регуляции клеточного цикла, а также посредством индукции секретуемых сигналов, которые оказывают влияние на соседние ткани [37].

В последние годы активно изучается роль микровезикул в процессе межклеточного взаимодействия. Так, при изучении роли miR-20a в регуляции пролиферации фибробластоподобных синовиоцитов и апоптозе при ревматоидном артрите было установлено, что экспрессия miR-20a была снижена в синовиальной ткани пациентов с РА с повышенным уровнем STAT3. Подавление miR-20a способствовало экспрессии STAT3, p-STAT3 и Bcl-2, облегчало пролиферацию клеток FLS, уменьшало апоптоз и, таким образом, играло критическую роль в РА. Сходные результаты были получены при исследовании роли и MicroRNA-29a и микровезикул, несущих церамид C24:1 [25, 27, 46]. Несомненно, важным фактором своевременной элиминации апоптотировавших клеток является эффективная работа фагоцитарной системы – избирательность, скорость и безопасность их удаления в процессе фагоцитоза [34]. Проведенное исследование позволяет полностью согласиться с высказыванием авторов работы [33]: «Анализ качественного и количественного характера активации Т-клеток в различных иммунологических условиях, "при апоптозе" дает ценную информацию об иммунных реакциях, опосредованных различными агентами, способствующую разработке более эффективных методов прогнозирования, мониторинга и лечения заболевания».

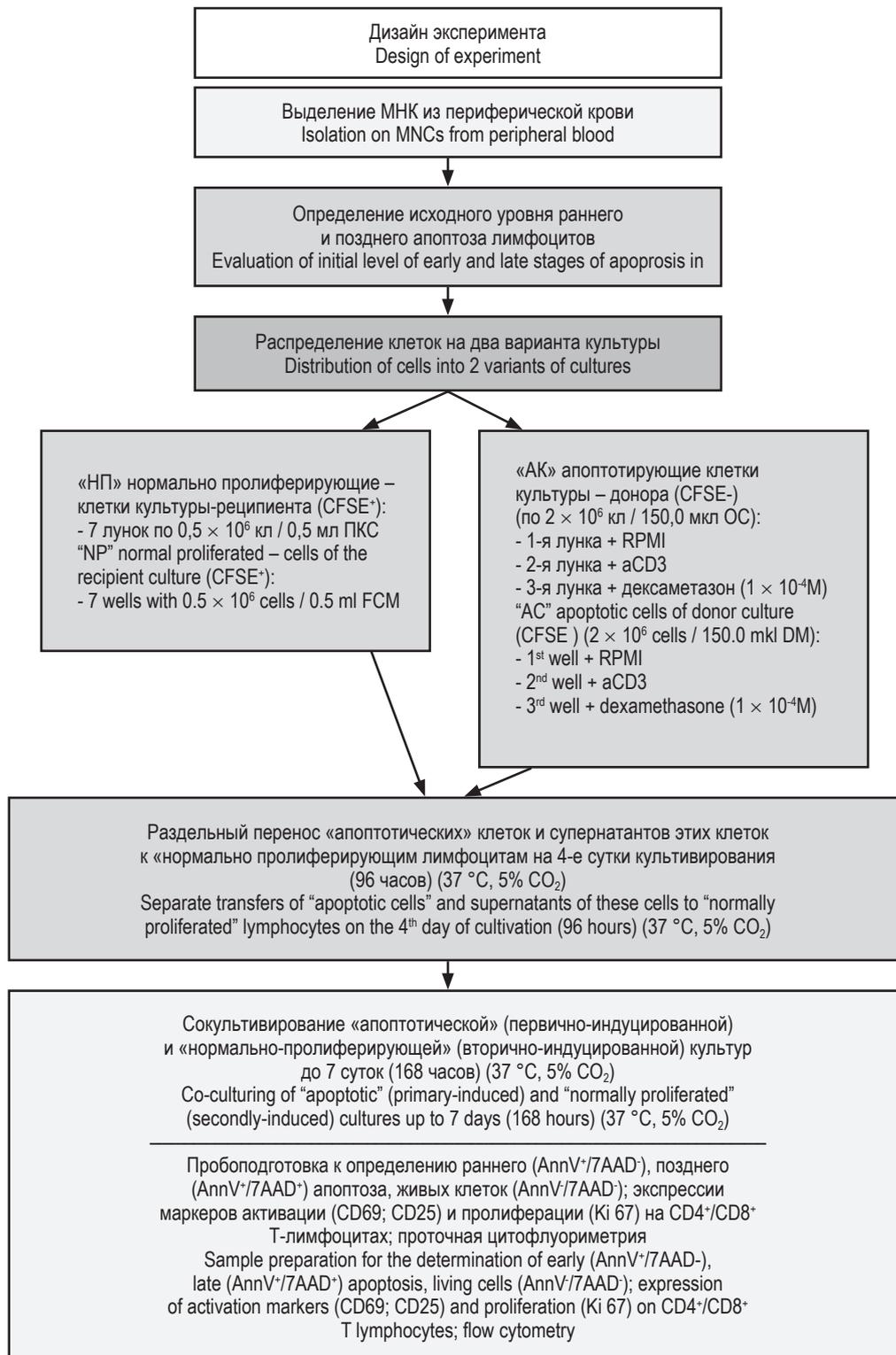
Таким образом, применение модели «клеточного соседства», в которой совместно культивировались клеточные и гуморальные компоненты CFSE⁻ культуры, подвергнутой наиболее физиологичному варианту активационного апоптоза (инкубации в условиях скученности и обеднения культуральной среды) и аутологичные CFSE⁺ клетки, пролиферирующие в полной культуральной среде, выявило на Т-лимфоцитах CFSE⁺ культуры более высокие параметры активации CD25⁺ и CD69⁺ и более низкие маркеры пролиферации Ki-67⁺ у здоровых людей относительно пациентов. В отличие от здоровых людей, у пациентов с РА установлено значимое повышение экспрессии Ki-67 на Т-лимфоцитах в динамике совместного культивирования CFSE⁻ и CFSE⁺ культур.

Увеличение числа живых клеток в апоптотических культурах больных РА относительно показателей здоровых людей на фоне отсутствия значимых различий по параметрам апоптоза и динамики активационных маркеров, а также характер изменений содержания клеток несущих Ki-67 свидетельствует о вкладе неавтономных эффектов апоптоза в клеточный гомеостаз у пациентов с РА.

ТАБЛИЦА 4. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ (РА)

TABLE 4. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS (RA)

№	Возраст Age	Диагноз Diagnosis	Длительность Duration of the disease	Лечение Treatment
1	48	РА, поздняя стадия, активность умеренная, DAS28 3.09, эрозивный III-VI, стадия, ФКII RA, late stage, moderate activity, DAS28 3.09, erosive III-VI stage, functional class (FC) II	> 19 лет > 19 years	Замена Сульфасалазина на Метотрексат 10 мг 1 р/нед. Replacing Sulfasalazine with Methotrexate 10 mg 1/week
2	66	РА, развернутая стадия, активность высокая DAS 28 5,76, аСРР (-), МСВ (-), Rg I ст., ФК II RA, extended stage, high activity, DAS28 5.76, aCCP (-), MCV (-), Rg I stage, FC II	> 13 лет > 13 years	Метотрексат 10 мг/нед., преднизолон 5 мг в сутки Methotrexate 10 mg/week, prednisolone 5 mg per day
3	63	РА, развернутая стадия, активность высокая, DAS28-5,2, АЦЦП (+), Rg II ст., эрозивный, ФКII RA, extended stage, high activity, DAS28 5.2, aCCP (+), Rg II stage, erosive, FC II	< 14 лет < 14 years	Метотрексат 15 мг/нед. пульс-терапия препаратом Солумедрол 500 мг в/в кап № 3 Methotrexate 15 mg/week pulse therapy with Solumedrol 500 mg intravenous drip N3
4	49	РА, развернутая стадия, активность умеренная (DAS28 – 3,74), АЦЦП (+), (Rg-II) неэрозивный, ФК-II RA, extended stage, moderate activity, DAS28 3.74, aCCP (+), Rg II stage, nonerosive, FC II	< 20 лет < 20 years	Арава 20 мг Arava 20 mg
5	56	РА, развернутая стадия, активность высокая (DAS 28 = 6,4), Rg III, эрозивный, ФКII RA, extended stage, high activity, DAS28 6.4, Rg III stage, erosive, FC II	< 8 лет < 8 years	Метилпреднизолон 500 мг в/в кап. № 3 Метотрексат 20 мг Methylprednisolone 500 mg intravenous drip N3, Methotrexate 20 mg
6	65	РА, развернутая стадия, активность умеренная (DAS28 = 4,88) с системными проявлениями (в анамнезе анемия, полинейропатия), RIII, эрозивный, ФКIII RA, extended stage, moderate activity, DAS28 4.88, with systemic manifestations (anemia, polyneuropathy), Rg III stage, erosive, FC III	> 13 лет > 13 years	Метотрексат, Ацеллбия 500 мг в/в капельно Methotrexate, Acellbia 500 mg intravenous drip

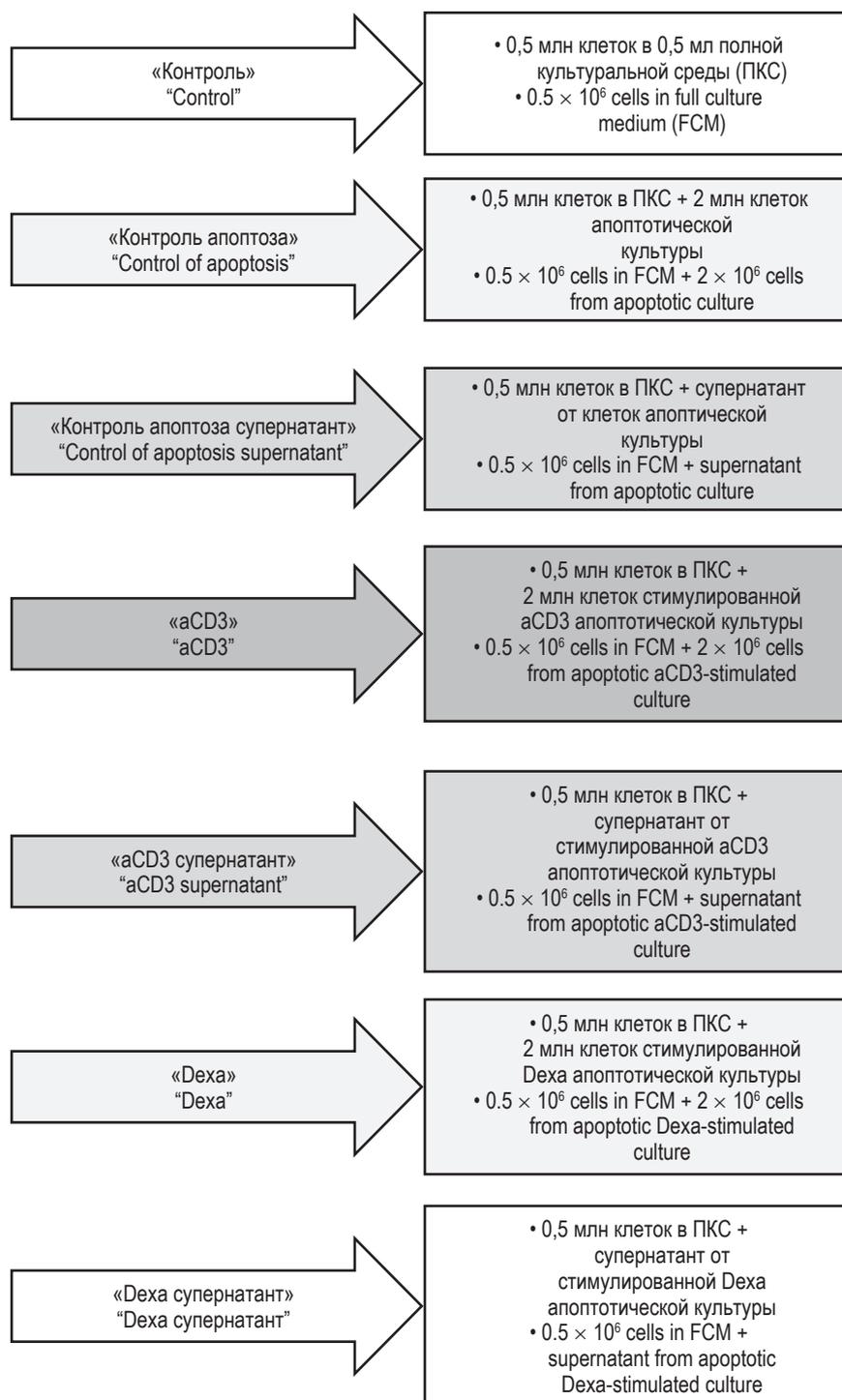


Примечание. «НП» – нормально пролиферирующая культура клеток (CFSE⁺); «АК» – апоптотическая культура клеток (CFSE⁻); «ПКС» – полная культуральная среда; «ОС» – обедненная среда; (CFSE⁻) – клетки культуры-донора; (CFSE⁺) – клетки культуры-реципиента

Note. “NP”, normally proliferated cell culture (CFSE⁺); “AC”, apoptotic cell culture (CFSE⁻); “FCM”, full culture medium; “DM”, depleted culture medium; (CFSE⁻), cells of the donor-culture; (CFSE⁺), cells of the recipient-culture.

НОМИНАЛЬНЫЕ НАЗВАНИЯ СОВМЕСТНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОБ КЛЕТОК ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ В ПОЛНОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ (НП) И АУТОЛОГИЧНЫХ АПОПТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК (АК)

NOMINAL NAMES OF CO-CULTURED SAMPLES OF CELLS, PROLIFERATED IN A FULL CULTURE MEDIUM (NP), AND AUTOLOGOUS APOPTOTIC CELLS (AC)



Примечание. Объемы переносимых клеток и супернатантов были доведены ПКС до равных объемов – 0,5 мл.

Note. The volumes of transferred cells and supernatants were equalized by FCM to 0.5 ml.

Список литературы / References

1. Арефьева А.С. Роль апоптоза в развитии системных аутоиммунных заболеваний // Иммунология, 2014. Т. 35, № 2. С. 103-107. [Arefyeva A.S. Role of apoptosis in the development of systemic autoimmune diseases. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no 2, pp 103-107. (In Russ.)].
2. Богданов А.Н., Камилова Т.А., Цыган В.Н., Цыган Е.Н. Роль апоптоза в патогенезе ревматоидного артрита (сообщение 2) // Научно-практическая ревматология, 2006. № 1. С. 40-48. [Bogdanov A.N., Kamilova T.A., Tsygan V.N., Tsygan E.N. The role of apoptosis in pathogenesis of rheumatoid arthritis report. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2006, no. 1, pp. 40-48. (In Russ.)]
3. Боровкова Н.В., Александрова И.В., Валетова В.В., Кобзева Е.Н. Апоптоз лимфоцитов крови в норме и при патологии // Молекулярная медицина, 2013. № 4. С. 41-45. [Borovkova N.V., Aleksandrova I.V., Valetova V.V., Kobzeva E.N. Blood lymphocyte apoptosis in norm and pathology. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2013, no. 4, pp. 41-45. (In Russ.)]
4. Гомзикова М.О., Гайфуллина Р.Ф., Мустафин И.Г., Чернов В.М., Мифтахова З.Р., Галявич А.С., Ризванов А.А. Мембранные микровезикулы: биологические свойства и участие в патогенезе заболеваний // Гены и Клетки, 2013. Т. 8, № 1. С. 6-11. [Gomzikova M.O., Gaifullina R.F., Mustafin I.G., Chernov V.M., Miftahova Z.R., Galyavich A.S., Rizvanov A.A. Membrane microvesicles: biological properties and involvement in pathogenesis of diseases. *Geny i Kletki = Genes and Cells*, 2013, Vol. 8, no. 1, pp. 6-11. (In Russ.)]
5. Ковалева О.В., Шитова М.С., Зборовская И.Б. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания // Клиническая онкогематология, 2014. Т. 7, № 2. С. 103-113. [Kovaleva O.V., Shitova M.S., Zborovskaya I.B. Autophagy: cell death or survival strategy? *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*, 2014, Vol. 7, no. 2, pp. 103-113. (In Russ.)]
6. Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В., Кривоносова О.А., Зенкова Т.В., Макеева О.В., Швец О.Ю. Цитометрический анализ экспрессии маркеров активации на CD4 Т-лимфоцитах при ревматоидном артрите // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 2. С. 332-334. [Kostolomova E.G., Sukhovei Yu.G., Unger I.G., Akuneeva T.V., Korotkevich O.A., Zenkova T.V., Makeeva O.V., Shvets O.Yu. Flow cytometric analysis expression markers of activation on CD4 T-lymphocytes at rheumatoid arthritis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, Vol. 13 (22), no. 2, pp. 332-334. (In Russ.)]
7. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 7-26. [Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhonevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Kaigorodova E.V., Goncharov A.G. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 7-26. (In Russ.)]. doi:10.15789/1563-0625-2014-1-7-26.
8. Панафидина Т.А., Кондратьева Л.В., Герасимова Е.В. Коморбидность при ревматоидном артрите // Научно-практическая ревматология, 2014. Т. 52, № 3. С. 283-289. [Panafidina T.A., Kondratyeva L.V., Gerasimova E.V., Novikova D.S., Popkova T.V. Comorbidity in rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2014, Vol. 52, no. 3, pp. 283-289. (In Russ.)]
9. Фомченко Н.Е., Воропаев Е.В. Биологические аспекты апоптоза (обзор литературы) // Проблемы здоровья и экологии, 2013. Т. 35, № 1. С. 39-45. [Fomchenko N.E., Voropayev E.V. Biological aspects of apoptosis (literature review). *Problemy zdorovya i ekologii = Problems of Health and Ecology*, 2013, Vol. 35, no. 1, pp. 39-45. (In Russ.)]
10. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Цитометрический анализ в клинической иммунологии. Екатеринбург: УрО РАН, 2011. 220 с. [Khaydukov S.V., Zurochka A.V., Chereshevnev V.A. Cytometric analysis in the clinical immunology]. Ekaterinburg: Ural Branch, Russian Academy of Sciences. 2011, 220 p.
11. Чубарова С.В., Чернова И.А., Крапошина А.Ю., Соловьева И.А., Демко И.В., Салмина А.Б., Малиновская Н.А. Апоптоз лимфоцитов периферической крови при бронхиальной астме различной степени тяжести // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2013. № 48. С. 28-32. [Chubarova S.V., Chernova I.A., Kraposhina A.Yu., Solovyeva I.A., Demko I.V., Salmina A.B., Malinovskaya N.A. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes at bronchial asthma of a different severity degree. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin of Respiratory Physiology and Pathology*, 2013, no. 48, pp. 28-32. (In Russ.)]
12. Banuelos J., Shin S., Cao Y., Bochner B.S., Morales-Nebreda L., Budinger G.R., Zhou L., Li S., Xin J., Lingen M.W., Dong C., Schleimer R.P., Lu N.Z. BCL-2 protects human and mouse Th17 cells from glucocorticoid-induced apoptosis. *Allergy*, 2016, Vol. 71, no. 5, pp. 640-650.
13. Bussari S., Jeergal P.A., Sarode M., Namazi N.A., Kulkarni P.G., Deshmukh A., Kulkarni D. Evaluation of proliferative marker Ki-67 in adenoid cystic carcinoma: A retrospective study. *J. Contemp. Dent. Pract.*, 2019, Vol. 20, no. 2, pp. 211-215.
14. Cao Y., Liu J. Impaired apoptosis of peripheral blood CD4⁺ T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2015, Vol. 31, no. 5, pp. 682-685.
15. Chen L., Jondal M., Yakimchuk K. Regulatory effects of dexamethasone on NK and T cell immunity. *Inflammopharmacology*, 2018, Vol. 26, no. 5, pp. 1331-1338.

16. Eroglu M., Derry W.B. Your neighbours matter – non-autonomous control of apoptosis in development and disease. *Cell Death Differ.*, 2016, Vol. 23, pp. 1110-1118.
17. Feng F.B., Qiu H.Y. Effects of Artesunate on chondrocyte proliferation, apoptosis and autophagy through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rat models with rheumatoid arthritis. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, Vol. 102, pp. 1209-1220.
18. Filková M., Jüngel A., Gay R.E., Gay S. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *BioDrugs*, 2012, Vol. 26, no. 3, pp. 131-141.
19. Fuchs Y., Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 2011, Vol. 147, no. 4, pp. 742-758.
20. Galluzzi L., Pietrocola F., Bravo-SanPedro J.M., Amaravadi R.K., Baehrecke E.H., Cecconi F., Codogno P., Debnath J., Gewirtz D.A., Karantza V., Kimmelman A., Kumar S., Levine B., Maiuri M.C., Martin S.J., Penninger J., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Simon H.U., Simonsen A., Thorburn A.M., Velasco G., Ryan K.M., Kroemer G. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.*, 2015, Vol. 34, no. 7, pp. 856-880.
21. Galluzzi L., Vitale I., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R., Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M.E., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Shi Y., Simon H. U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*, 2012, Vol. 19, no. 1, pp. 107-120.
22. Hao X., Liu R., Zhang Y., Li Y., He Q., Huang Y., Jiang Y., Ma J., Li P., Wei H. Glt25d2 knockout directly increases CD25⁺CD69⁻ but decreases CD25⁺CD69⁺ subset proliferation and is involved in concanavalin-induced hepatitis. *Cell Physiol. Biochem.*, 2018, Vol. 50, no. 3, pp. 1186-1200.
23. Huang W., Zhang L., Cheng C., Shan W., Ma R., Yin Z., Zhu C. Parallel comparison of fibroblast-like synoviocytes from the surgically removed hyperplastic synovial tissues of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord.*, 2019, Vol. 20, no. 1, 591. doi: 10.1186/s12891-019-2977-2.
24. Kawamoto Y., Nakajima Y., Kuranaga E. Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 12, 2144. doi: 10.3390/ijms17122144.
25. Khayrullin A., Krishnan P., Martinez-Nater L., Mendhe B., Fulzele S., Liu Y., Mattison J.A., Hamrick M.W. Very long-chain C24:1 ceramide is increased in serum extracellular vesicles with aging and can induce senescence in bone-derived mesenchymal stem cells. *Cells*, 2019, Vol. 8, no. 1, 37. doi: 10.3390/cells8010037.
26. Klöditz K., Chen Y.Z., Xue D., Fadeel B. Programmed cell clearance: From nematodes to humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, Vol. 482, no. 3, pp. 491-497.
27. Liu J., Fei D., Xing J., Du J. MicroRNA-29a inhibits proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by repressing STAT3. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, Vol. 96, pp. 173-181.
28. Mann E.H., Gabryšová L., Pfeffer P.E., O'Garra A., Hawrylowicz C.M. High-dose IL-2 skews a glucocorticoid-driven IL-17⁺IL-10⁺ memory CD4⁺ T cell response towards a single IL-10-producing phenotype. *J. Immunol.*, 2019, Vol. 202, no. 3, pp. 684-693.
29. Mašlanka T., Jaroszewski J.J. *In vitro* studies on the influence of dexamethasone and meloxicam on bovine WC1⁺γδ T cells. *Vet. ImmunolImmunopathol.*, 2013, Vol. 151, no. 3-4, pp. 248-262.
30. Menon S.S., Guruvayoorappan C., Sakthivel K.M., Rasmi R.R. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin. Chim. Acta*, 2019, Vol. 491, pp. 39-45.
31. Mijaljica D., Nazarko T.Y., Brumell J.H., Huang W.P., Komatsu M., Prescott M., Simonsen A., Yamamoto A., Zhang H., Klionsky D.J., Devenish R.J. Receptor protein complexes are in control of autophagy. *Autophagy*, 2012, Vol. 8, no. 11, pp. 1701-1705.
32. Moore T.L. Immune complexes in juvenile idiopathic arthritis. *Front Immunol.*, 2016, Vol. 7, 177. doi: 10.3389/fimmu.2016.00177.
33. Motamedi M., Xu L., Elahi S. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J. Immunol. Methods*, 2016, Vol. 437, pp. 43-52.
34. Nonaka S., Shiratsuchi A., Nagaosa K., Nakanishi Y. Mechanisms and significance of phagocytic elimination of cells undergoing apoptotic death. *Biol. Pharm. Bull.*, 2017, Vol. 40, no. 11, pp. 1819-1827.
35. Parzych K.R., Klionsky D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal.*, 2014, Vol. 20, no. 3, pp. 460-473.
36. Pérez-Garijo A., Steller H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development*, 2015, Vol. 142, no. 19, pp. 3253-3262.
37. Pérez-Garijo A. When dying is not the end: apoptotic caspases as drivers of proliferation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2018, Vol. 82, pp. 86-95.
38. Perez-Garijo A., Fuchs Y., Steller H. Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway. *Elife*, 2013, Vol. 2, e01004. doi: 10.7554/eLife.01004.
39. Rajasekhar M., Olsson A.M., Steel K.J., Georgouli M., Ranasinghe U., Brender Read C., Frederiksen K.S., Taams L.S. MicroRNA-155 contributes to enhanced resistance to apoptosis in monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.*, 2017, Vol. 79, pp. 53-62.

40. Schläfli A.M., Adams O., Galván J.A., Gugger M., Savic S., Bubendorf L., Schmid R.A., Becker K.F., Tschan M.P., Langer R., Berezowska S. Prognostic value of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 26, pp. 39544-39555.
41. Shen C., Gu W., Cai G.Q., Peng J.P., Chen X.D. Autophagy protects meniscal cells from glucocorticoids-induced apoptosis via inositol trisphosphate receptor signaling. *Apoptosis*, 2015, Vol. 20, no. 9, pp. 1176-1186.
42. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin. Chim. Acta*, 2012, Vol. 413, no. 17-18, pp. 1338-1349.
43. Suzanne M., Steller H. Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death Differ.*, 2013, Vol. 20, no. 5, pp. 669-675.
44. Veale D.J., Orr C., Fearon U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. *Semin. Immunopathol.*, 2017, Vol. 39, pp. 343-354.
45. Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin. Biochem.*, 2016, Vol. 49, no. 4-5, pp. 347-354.
46. Wei X.J., Li X.W., Lu J.L., Long Z.X., Liang J.Q., Wei S.B., Lu C.X., Lu W.Z. MiR-20a regulates fibroblast-like synoviocyte proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2017, Vol. 21, no. 17, pp. 3886-3893.

Авторы:

Абрамова Т.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии; ассистент кафедры клинической иммунологии, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Блинова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

Чумасова О.А. — к.м.н., врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, научный консультант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии; заведующий кафедрой клинической иммунологии, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Authors:

Abramova T.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; Assistant, Department of Clinical Immunology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Blinova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Grishina L.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chumasova O.A., PhD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Immune Pathology Clinic, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sulutyan A.E., PhD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Immune Pathology Clinic, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Scientific Advisor, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; Head, Department of Clinical Immunology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 01.04.2020
Отправлена на доработку 23.04.2020
Принята к печати 29.06.2020

Received 01.04.2020
Revision received 23.04.2020
Accepted 29.06.2020

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ЗАВИСИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ИНТЕГРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИММУННЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНОГО ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ СУЩЕСТВОВАНИЯ ТУБЕРКУЛЕМЫ ЛЕГКОГО?

Бердюгина О.В.

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

Резюме. Неснижаемое количество больных туберкулезом в последние годы в стране и в мире обусловлено устойчивостью возбудителя и изменением механизмов восприятия бактерии иммунной системой человека, что требует пристального изучения. Слияние клеток между собой в процессе формирования туберкулем включает большое количество адгезивных событий. Показано, что интегрин $\alpha 1\beta 1$ важен для целостности гранулемы во время хронической фазы инфекции. Доказано, что за туберкулемами необходимо осуществлять наблюдение, в том числе с детекцией клеток, экспрессирующих CD11c, так как они поддерживают непрерывное примирование Т-клеток на различных стадиях инфекции. Целью данного исследования стало изучение вопроса: существует ли различие в экспрессии интегрина рецепторов иммунными клетками периферической крови больного на разных этапах существования туберкулемы легкого? В исследовании приняли участие 38 человек: первая группа (контрольная) из 15 практически здоровых людей; вторая группа из 11 человек с туберкулемами легких; диагноз впервые был установлен за 2-10 месяцев до проведения настоящего исследования; третья группа из 12 человек с туберкулемами легких; диагноз впервые был установлен за 12-219 месяцев до данного исследования. Всем участникам выполнялось общеклиническое исследование крови с использованием анализатора 5 Diff Mythic 22 AL (Cormay, Польша). Маркеры адгезии CD11b, CD11c детектировали на приборе фирмы Beckman Coulter (США) Coulter Epicx XL. Определяли следующие популяции клеток периферической крови: CD14-CD13^{low}CD11b⁺, CD14-CD13^{low}CD11c⁺, CD14⁺CD11b⁺, CD14⁺CD11c⁺, CD45⁺CD3-CD16⁺CD56⁺, CD45⁺CD3-CD16⁺CD56⁺CD11b⁺. Статистическая обработка полученных результатов выполнялась в операционной среде Windows 10 (Microsoft Corp., США), с использованием компьютерной программы Statistica v. 12.5 (StatSoft, США). В качестве критериев оценки различий между сравниваемыми группами использовали Kruskal–Wallis one-way analysis of variance (p_{k-w}) при уровне значимости различий $p < 0,017$, а также Wald–Wolfowitz test (p_{w-w}) при уровне значимости различий $p < 0,05$. Дополнительно реализованы кластерный и факторный виды анализа. Исследуя роль β_2 -интегринов установлено, что они играют важное значение в поддержании существования туберкулезных гранул. Отличительным для туберкулем легких, выявленных за 0,5 года

Адрес для переписки:

Бердюгина Ольга Викторовна,
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (904) 988-43-82.
E-mail: berolga73@rambler.ru

Address for correspondence:

Berdyugina Olga V.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian
Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,
Pervomayskaya str., 106.
Phone: 7 (904) 988-43-82.
E-mail: berolga73@rambler.ru

Образец цитирования:

О.В. Бердюгина «Существует ли зависимость экспрессии интегрина рецепторов иммунными клетками периферической крови больного от длительности существования туберкулемы легкого?» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 867-878. doi: 10.15789/1563-0625-ITA-2088
© Бердюгина О.В., 2020

For citation:

Berdyugina O.V. "Is there a dependence between expression of integrin receptors by peripheral blood immune cells and duration of tuberculous granuloma existence in the patients?", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 867-878. doi: 10.15789/1563-0625-ITA-2088
DOI: 10.15789/1563-0625-ITA-2088

до исследования стали увеличение общего числа гранулоцитов и гранулоцитов, экспрессирующих CD11b, снижение популяции лимфоцитов, NK-клеток и NK-клеток, экспрессирующих CD11c. Характерными изменениями, наблюдаемыми при изучении периферической крови больных с туберкулезом легких, выявленными за 9,5 лет до исследования были: увеличение популяции лейкоцитов, общего числа моноцитов, а также моноцитов, экспрессирующих CD11b и CD11c.

Ключевые слова: туберкулема, периферическая кровь, проточная цитометрия, CD11b, CD11c, моноциты, нейтрофилы, NK-клетки, кластерный анализ, факторный анализ

IS THERE A DEPENDENCE BETWEEN EXPRESSION OF INTEGRIN RECEPTORS BY PERIPHERAL BLOOD IMMUNE CELLS AND DURATION OF TUBERCULOUS GRANULOMA EXISTENCE IN THE PATIENTS?

Berdyugina O.V.

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Over recent years, the number of patients with tuberculosis has not decreased in the country and in worldwide. This is due to high resistance of the pathogen and changing mechanisms of bacterial perception by the human immune system thus requiring closer examination of the issue. Cell fusion during the formation of pulmonary tuberculous granuloma involves a large number of adhesive events. Importance of $\alpha 1\beta 1$ integrin has been shown for the granuloma integrity during the chronic phase of infection. It has been proven that pulmonary tuberculous granuloma should be monitored, including with the detection of cells expressing CD11c, since they support the continuous priming of T cells at different stages of infection. The aim of this study was to answer the question, if there is a different expression of integrin receptors by immune cells from the patient's peripheral blood at different stages of the existence of pulmonary tuberculous granuloma? The study involved 38 people: the first group (control) consisted of 15 practically healthy people; a second group included 11 subjects with pulmonary tuberculous granuloma; the condition was first diagnosed 2 to 10 months before the present study. A third group consisted of 12 patients with pulmonary tuberculous granuloma, with primary diagnosis established 12 to 219 months before this study. All the participants underwent a general clinical blood tests using a 5 Diff Mythic 22 AL analyzer (Cormay, Poland). The adhesion markers CD11b, CD11c were detected with a Coulter Epicx XL instrument (Beckman Coulter, USA). The following peripheral blood cell populations were determined: CD14⁻CD13^{low}CD11b⁺, CD14⁻CD13^{low}CD11c⁺, CD14⁺CD11b⁺, CD14⁺CD11c⁺, CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺, CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺CD11b⁺. Statistical processing of the results was performed in the Windows 10 operating environment (Microsoft Corp., USA), using Statistica v. 12.5 software (StatSoft, USA). Kruskal–Wallis one-way analysis of variance (p_{k-w}), with differences significant at $p < 0.017$, as well as the Wald–Wolfowitz test (p_{w-w}) at a significance level of $p < 0.05$ were used as criteria for assessing differences between the compared groups. In addition, cluster and factor analysis were implemented. When studying the role of $\beta 2$ -integrins, we have found that they play an important role in maintaining the existence of pulmonary tuberculous granuloma. An increase in total number of granulocytes, and CD11b-expressing granulocytes, a decrease in the population of lymphocytes, NK cells and NK cells expressing CD11c proved to be distinctive in cases of pulmonary tuberculous granuloma detected 0.5 years before the study. Characteristic changes observed in the study of peripheral blood in the patients with pulmonary tuberculous granuloma detected 9.5 years before the study were as follows: an increase in the leukocyte population, total monocyte number, as well as CD11b- and CD11c-expressing monocytes.

Keywords: tuberculous granuloma, peripheral blood, flow cytometry, CD11b, CD11c, monocytes, neutrophils, NK cells, cluster analysis, factor analysis

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН № гос. регистрации АААА-А18-118020590108-7.

Введение

Интегрины, экспрессируемые клетками иммунной системы, осуществляют непосредственный контакт с линкерными поверхностями других клеток или белков внеклеточного матрикса [11]. На наружной мембране в процессе активации появляется значительное число молекул, например, поверхность активированного макрофага покрывается 371 798 антигенами CD11b [10].

Интегрин $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ (альфа-М/бета-2, CD11b), являющийся рецептором фибриногена и С3b компонента комплемента, принимает участие в регуляции процессов миграции и фагоцитоза, а именно: захвата частиц, покрытых компонентом, их поглощения, генерации супероксидных анионов, дегрануляции [15]. CD11b опосредует активацию клеток, хемотаксис и цитотоксичность [5]. Роль $\beta\text{-интегринов}$ в модулировании передачи сигналов через TLR (toll-like receptor, толл-подобный рецептор) сложна: полагают, что в воспалении, опосредованном TLR4, функция $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ зависит вида клетки, на которой он экспрессирован [11]. Функции интегрин CD11b могут изменяться в зависимости от присутствия цитокинов, а именно: при наличии IL-2 (interleukin, интерлейкин) – продляют продолжительность жизни иммунных клеток, при TNF α (tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли) – вызывают апоптоз и избирательное удаление [6]. $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ локализован преимущественно на моноцитах, гранулоцитах и NK-клетках [2].

Широко известен тот факт, что оба рецептора комплемента CR3 (CD11b/CD18) и CR4 (CD11c/CD18) принадлежат к семейству бета2-интегринов. Поскольку основной лиганд CR3 и CR4 идентичен, изучение индивидуальной функции этих интегринов представляет достаточно сложную задачу [10]. Между тем, имеются данные, что интегрин альфа-X (αX , CD11c) путем взаимодействия с фрагментом бета-2 и формирования молекулы $\alpha\text{X}\beta\text{2}$ обеспечивает, в отличие от CD11b, участие и межклеточные взаимодействия в реакциях воспаления [11]. Этот интегрин определяет процесс адгезии моноцитов при хемотаксисе и экспрессирован преимущественно на микро- и макрофагоцитах.

Неснижаемое количество больных туберкулезом в последние годы в стране и в мире обусловлено устойчивостью возбудителя и изменением механизмов восприятия бактерии иммунной системой человека, что требует пристального изучения [7]. В патогенезе формирования тубер-

кулем важную роль играют моноциты-макрофаги, обеспечивающие процесс ограничения патологического процесса [13]. Многоядерные гигантские клетки признаны общей чертой существования туберкулем [9]. Слияние клеток между собой в процессе формирования туберкулем включает большое количество адгезивных событий. Показано участие в этом процессе нескольких рецепторов клеточной поверхности: SIRP α (signal-regulatory protein, сигнального регуляторного белка), CD47, CD44, Е-кадгерина, тетраспанинов, DC-STAMP (dendritic cell specific transmembrane protein, трансмембранного белка, экспрессируемого дендритными клетками) и других, а также некоторых интегринов [4]. Установлено, что инфекционный процесс в туберкулемах динамичен: бактерии регулярно перемещаются в новые клетки даже во время хронической стадии инфекции [8]. Есть данные, свидетельствующие, что поглощение *M. tuberculosis* мононуклеарами частично опосредовано рецепторами комплемента, включая CR3 [3]. Показано, что интегрин $\alpha\text{I}\beta\text{1}$ важен для целостности гранулемы во время хронической фазы инфекции [14]. Доказано, что за туберкулемами необходимо осуществлять наблюдение, в том числе с детекцией клеток, экспрессирующих CD11c, так как они поддерживают непрерывное примирование Т-клеток на различных стадиях инфекции [12].

Целью данного исследования стало изучение вопроса: существует ли различие в экспрессии интегриновых рецепторов иммунными клетками периферической крови больного на разных этапах существования туберкулемы легкого?

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 38 человек: здоровые добровольцы и люди, больные туберкулезом легких. Последние были дифференцированы на две группы, в зависимости от того, какой диапазон времени прошел с момента установления диагноза до настоящего исследования: длительный или нет, что соответствовало срокам существования туберкулемы легких.

Контрольная группа (группа № 1) была представлена 15 практически здоровыми людьми, 8 из которых были мужчины (53,3%), 7 – женщины (46,7%), средний возраст на момент обследования составил 27,1 года.

Вторую группу исследования (группа № 2) составили больные с туберкулемами легких; диагноз был установлен впервые за 2-10 месяцев (60-300 суток) до проведения настоящего исследования, что в среднем составило 6 месяцев (180 суток). В группу входило 11 человек, 6 из которых были мужчины (54,5%), 5 – женщины

(45,5%), средний возраст пациентов составил 32,9 лет.

Третья группа (группа № 3) была представлена больными с туберкулемами легких; диагноз впервые был установлен за 12–219 месяцев (365–6570 суток) до данного исследования. В эту когорту были включены 12 человек, 7 мужчин (58,3%) и 5 женщин (41,7%), средний возраст которых составил 34,8 лет.

Здесь и далее по тексту для стандартизации изложения материала было принято считать, что в группе № 2 диагноз был установлен за полгода до выполнения исследования, а в группе № 3 – за 9,5 лет до изучения, то есть временная разница наблюдений составила 19 раз. Во всех случаях возбудитель заболевания имел множественную лекарственную устойчивость. Среди обследованных не было инфицированных вирусом иммунодефицита человека.

Всем участникам выполнялось общеклиническое исследование крови, которую получали из периферической вены верхней конечности методом флеботомии натошак. В качестве антикоагулянта использовали этилендиаминтетрауксусную кислоту (ethylenediaminetetraacetic acid, K₂EDTA) в концентрации 1,6 мг/мл. Определение общего количества лейкоцитов и изучение основных популяций клеток крови выполняли, используя анализатор 5 Diff Mythic 22 AL (Cormay, Польша). Маркеры адгезии CD11b, CD11c детектировали на приборе фирмы Beckman Coulter (США) Coulter Epicx XL. Пробоподготовку биологического материала проводили на станции Coulter Q-Prep фирмы Beckman Coulter (США) с использованием реагентов того же производителя. Определяли следующие популяции клеток периферической крови: CD14⁺CD13^{low}CD11b⁺, CD14⁺CD13^{low}CD11c⁺, CD14⁺CD11b⁺, CD14⁺CD11c⁺, CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD11b⁺.

Статистическая обработка полученных результатов выполнялась в операционной среде Windows 10 (Microsoft Corp., США), с использованием компьютерной программы Statistica v. 12.5 (StatSoft, США). Предварительно оценивали нормальность распределения данных для чего использовали ряд критериев: Шапиро–Уилка, Колмогорова–Смирнова, асимметрии и эксцесса, построения плоскостных, 2D, а также нормализованных вероятностных графиков. В качестве критериев оценки различий между сравниваемыми группами использовали Kruskal–Wallis one-way analysis of variance (p_{k-w}) при уровне значимости различий $p < 0,017$ (между тремя несвязанными группами № 1, № 2 и № 3), а также Wald–Wolfowitz test (p_{w-w}) при уровне значимости различий $p < 0,05$ (между двумя несвязанными

группами № 2 и № 3). Для установления зависимости между изученными лабораторными показателями и клиническими данными выполнялся факторный анализ. Дополнительно реализован кластерный анализ.

Результаты и обсуждение

Изучению полученных данных предшествовала оценка характера их распределения. Установлено, что большая часть выборок лабораторных показателей, однако далеко не все, не подчинялись закону Гаусса. Это дало основание полагать, что для оценки различий между группами возможно использование непараметрических критериев.

Оценивая лейкопоз в исследованных группах (табл. 1), было обнаружено, что у больных с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 9,5 лет до исследования, отмечалось увеличение популяции лейкоцитов в периферической крови на 15,7% ($p_{k-w} < 0,016$) в сравнении с контрольной группой.

Популяция гранулоцитов была наибольшей у пациентов с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 0,5 года до исследования.

Экспрессия молекул адгезии имела особенности. Количество клеток, экспрессирующих CD11b, было повышено у больных с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 0,5 года до исследования на 22,7% ($p_{k-w} < 0,016$) в сравнении с контрольной группой. Популяция нейтрофилов, несущих на клеточной поверхности CD11c, была снижена и в группе больных с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 0,5 года до исследования, и у пациентов с туберкулемами, выявленными в среднем за 9,5 лет до исследования в 3,3 и 2,6 раза соответственно ($p_{k-w} < 0,016$). Изменения зарегистрированы в сравнении с контрольной группой.

Наличие обоих мембранных антигенов CD11b и CD11c обеспечивает прочность адгезии клетки на поверхности эндотелия для извлечения ее из циркуляторного русла. Это служит предпосылкой к контакту с микроорганизмами, покрытыми iC3b и их фагоцитозом с активацией НАДФ-зависимой оксидазы, что ранее уже было описано у больных, инфицированных *M. tuberculosis* [3]. Можно полагать, что, если отношение абсолютного количества гранулоцитов, экспрессирующих CD11b к абсолютному количеству гранулоцитов, экспрессирующих CD11c у больных с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 0,5 года до исследования, больше, чем у пациентов с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 9,5 лет до исследования, и составля-

ТАБЛИЦА 1. ДАННЫЕ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ГРУППАХ СРАВНЕНИЯ

TABLE 1. STATISTICAL ANALYSIS DATA IN COMPARISON GROUPS

Показатель, единицы измерения Indicator, units of measure	Контрольная группа (№ 1) Control group (No. 1)	Больные с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 0,5 года до исследования (№ 2) Patients with pulmonary tuberculous granulomas, which were discovered on average 0.5 years before the study (No. 2)	Больные с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 9,5 лет до исследования (№ 3) Patients with tuberculosis granulomas, which were discovered on average 9.5 years before the study (No. 3)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /l	5,40 4,60-5,95 5,63	5,50 4,80-6,85 6,00	6,25 5,38-8,40 6,76 p _{k-w} < 0,016 (№ 1)
Гранулоциты, % Granulocytes, %	58,75 46,50-65,00 57,04	57,70 46,00-64,00 56,11	53,70 50,35-57,90 55,55
Гранулоциты, 10 ⁹ /л Granulocytes, 10 ⁹ /l	3,11 2,00-4,01 3,36	3,80 2,45-4,74 3,55 p _{k-w} < 0,016 (№ 1)	3,45 2,49-4,67 3,76
Гранулоциты, экспрессирующие CD11b, % Granulocytes with expression CD11b, % CD14 ⁺ CD13 ^{low} CD11b ⁺	98,65 93,25-99,55 95,37	99,70 99,45-99,80 97,72 p _{k-w} < 0,016 (№ 1)	99,35 98,45-99,72 96,60
Гранулоциты, экспрессирующие CD11b, 10 ⁹ /л Granulocytes with expression CD11b, 10 ⁹ /l CD14 ⁺ CD13 ^{low} CD11b ⁺	2,91 1,89-3,65 3,18	3,57 2,21-4,46 3,45 p _{k-w} < 0,016 (№ 1)	3,47 2,42-4,63 3,66
Гранулоциты, экспрессирующие CD11c, % Granulocytes with expression CD11c, % CD14 ⁺ CD13 ^{low} CD11c ⁺	14,50 11,40-18,70 17,09	4,20 2,05-7,50 12,93 p _{k-w} < 0,016 (№ 1)	4,55 3,35-8,03 7,15 p _{k-w} < 0,005 (№ 1)
Гранулоциты, экспрессирующие CD11c, 10 ⁹ /л Granulocytes with expression CD11c, 10 ⁹ /l CD14 ⁺ CD13 ^{low} CD11c ⁺	0,36 0,29-1,04 0,67	0,11 0,04-0,32 0,62 p _{k-w} < 0,016 (№ 1)	0,14 0,08-0,41 0,28 p _{k-w} < 0,016 (№ 1)

Примечание. Данные представлены в формате: Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), M – медиана, межквартильный размах, среднее арифметическое величины. Уровень значимости: p_{k-w} (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) p < 0,017 (между тремя несвязанными группами № 1, № 2 и № 3); p_{w-w} (Wald–Wolfowitz test) p < 0,05 (между двумя несвязанными группами № 2 и № 3).

Note. The data are presented in the format: Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), M – median, interquartile range, arithmetic mean. Significance level: p_{k-w} (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) p < 0.017 (between three unrelated groups No. 1, No. 2 and No. 3); p_{w-w} (Wald–Wolfowitz test) p < 0.05 (between two unrelated groups No. 2 and No. 3).

ТАБЛИЦА 2. ДАННЫЕ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ГРУППАХ СРАВНЕНИЯ

TABLE 2. STATISTICAL ANALYSIS DATA IN COMPARISON GROUPS

Показатель, единицы измерения Indicator, units of measure	Контрольная группа (№ 1) Control group (No. 1)	Больные с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 0,5 года до исследования (№ 2) Patients with pulmonary tuberculous granulomas, which were discovered on average 0.5 years before the study (No. 2)	Больные с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 9,5 лет до исследования (№ 3) Patients with tuberculosis granulomas, which were discovered on average 9.5 years before the study (No. 3)
Моноциты, % Monocytes, %	7,00 6,13-8,50 7,46	9,45 8,25-10,00 8,94	8,60 6,50-10,25 8,34 $p_{k-w} < 0,015$ (№ 1)
Моноциты, $10^9/л$ Monocytes, $10^9/l$	0,38 0,34-0,44 0,40	0,47 0,40-0,61 0,52	0,50 0,44-0,53 0,56 $p_{k-w} < 0,013$ (№ 1)
Моноциты, экспрессирующие CD11b, % Monocytes with expression CD11b, % CD14 ⁺ CD11b ⁺	97,50 84,10-98,60 92,80	94,30 93,85-95,45 94,58	95,20 93,38-96,63 94,65 $p_{w-w} < 0,049$ (№ 2)
Моноциты, экспрессирующие CD11b, $10^9/л$ Monocytes with expression CD11b, $10^9/l$ CD14 ⁺ CD11b ⁺	0,35 0,29-0,43 0,38	0,44 0,37-0,56 0,48	0,46 0,42-0,50 0,52 $p_{k-w} < 0,016$ (№ 1)
Моноциты, экспрессирующие CD11c, % Monocytes with expression CD11c, % CD14 ⁺ CD11c ⁺	70,35 66,33-87,30 72,78	70,30 47,90-75,30 64,30	65,85 56,55-79,18 64,72 $p_{w-w} < 0,049$ (№ 2)
Моноциты, экспрессирующие CD11c, $10^9/л$ Monocytes with expression CD11c, $10^9/l$ CD14 ⁺ CD11c ⁺	0,30 0,22-0,39 0,31	0,26 0,23-0,45 0,34	0,35 0,27-0,40 0,34 $p_{k-w} < 0,016$ (№ 1)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ет, соответственно, 32,5 (в группе № 2) и 24,8 (в группе № 3), следовательно, преобладающее значение на ранних этапах формирования туберкулемы имеют именно интегрин $\alpha M\beta 2$, опосредующие фагоцитарные реакции. Такое вовлечение гранулоцитов в патологический процесс является косвенным свидетельством его повышенной активности в сравнении с наблюдениями, зафиксированными в группе больных с туберкулемами

легких, выявленными в среднем за 9,5 лет до исследования.

Другая группа клеток, которая была изучена, — моноциты периферической крови — в наибольшем количестве была представлена у больных с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 9,5 лет до исследования (табл. 2); количество клеток у этих пациентов было больше, чем в контрольной группе на 31,6% ($p_{k-w} < 0,013$).

ТАБЛИЦА 3. ДАННЫЕ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ГРУППАХ СРАВНЕНИЯ

TABLE 3. STATISTICAL ANALYSIS DATA IN COMPARISON GROUPS

Показатель, единицы измерения Indicator, units of measure	Контрольная группа (№ 1) Control group (No. 1)	Больные с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 0,5 года до исследования (№ 2) Patients with pulmonary tuberculous granulomas, which were discovered on average 0.5 years before the study (No. 2)	Больные с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 9,5 лет до исследования (№ 3) Patients with tuberculosis granulomas, which were discovered on average 9.5 years before the study (No. 3)
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	34,25 28,00-43,75 35,50	30,25 29,25-38,25 32,37	32,30 28,80-38,50 33,53 $p_{w-w} < 0,045$ (№ 2)
Лимфоциты, $10^9/л$ Lymphocytes, $10^9/l$	1,89 1,62-2,10 1,87	1,65 1,52-2,25 1,83 $p_{k-w} < 0,016$ (№ 1)	2,10 1,82-2,67 2,27 $p_{w-w} < 0,045$ (№ 2) $p_{k-w} < 0,016$ (№ 2)
НК-клетки, % NK-cells, % CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	13,70 10,25-16,55 13,19	9,50 7,30-11,35 9,65 $p_{k-w} < 0,016$ (№ 1)	8,50 7,25-13,95 12,17
НК-клетки, $10^9/л$ NK-cells, $10^9/l$ CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,25 0,16-0,38 0,26	0,13 0,12-0,17 0,17 $p_{k-w} < 0,016$ (№ 1)	0,25 0,18-0,27 0,27 $p_{w-w} < 0,045$ (№ 2) $p_{k-w} < 0,016$ (№ 2)
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, % NK-cells with expression CD11b, % CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺	96,50 92,75-100,00 96,60	88,03 79,15-100,00 88,02 $p_{k-w} < 0,016$ (№ 1)	90,98 83,65-100,00 90,99
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, $10^9/л$ NK-cells with expression CD11b, $10^9/l$ CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺	0,23 0,13-0,37 0,25	0,18 0,14-0,21 0,19 $p_{k-w} < 0,016$ (№ 1)	0,17 0,16-0,33 0,29

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Известно, что моноциты периферической крови имеют высокую экспрессию CD11b [10]. Согласно результатам наших исследований, в контрольной группе более чем 97% изученных клеток имели поверхностный интегрин $\alpha M\beta 2$ (табл. 2). У больных туберкулезом больше всего клеток с фенотипом CD14⁺CD11b⁺ было в группе с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 9,5 лет до исследования. Их количество

было на 31,4% больше, чем у здоровых людей ($p_{k-w} < 0,016$), и на 4,5% больше, чем у больных с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 0,5 года до исследования ($p_{w-w} < 0,049$).

Моноцитов, экспрессирующих CD11c в отличие от тех, что имели интегрин $\alpha M\beta 2$, как отмечалось некоторыми авторами [11], было меньше: согласно данным настоящего исследования примерно на 25,5%. Количество моноцитов, экспрес-

ТАБЛИЦА 4. МАТРИЦА ФАКТОРНЫХ НАГРУЗОК ГРУППЫ № 1

TABLE 4. MATRIX OF FACTOR LOADS OF GROUP No. 1

Показатель Indicator	Фактор I Factor I	Фактор II Factor II	Фактор III Factor III
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /l	0,956468	0,109682	0,041865
Гранулоциты, % Granulocytes, %	0,649656	0,740392	0,004104
Гранулоциты, 10 ⁹ /л Granulocytes, 10 ⁹ /l	0,910733	0,337779	0,041646
Гранулоциты, экспрессирующие CD11b, % Granulocytes with expression CD11b, % CD14 ⁻ CD13 ^{low} CD11b ⁺	0,482081	-0,270025	0,283347
Гранулоциты, экспрессирующие CD11b, 10 ⁹ /л Granulocytes with expression CD11b, 10 ⁹ /l CD14 ⁻ CD13 ^{low} CD11b ⁺	0,924798	0,293893	0,072438
Гранулоциты, экспрессирующие CD11c, % Granulocytes with expression CD11c, % CD14 ⁻ CD13 ^{low} CD11c ⁺	0,708526	0,301448	-0,207470
Гранулоциты, экспрессирующие CD11c, 10 ⁹ /л Granulocytes with expression CD11c, 10 ⁹ /l CD14 ⁻ CD13 ^{low} CD11c ⁺	0,868335	0,331446	-0,095861
Моноциты, % Monocytes, %	-0,425578	-0,742745	0,397220
Моноциты, 10 ⁹ /л Monocytes, 10 ⁹ /l	0,757520	-0,490338	0,317333
Моноциты, экспрессирующие CD11b, % Monocytes with expression CD11b, % CD14 ⁺ CD11b ⁺	0,666771	-0,140143	0,503554
Моноциты, экспрессирующие CD11b, 10 ⁹ /л Monocytes with expression CD11b, 10 ⁹ /l CD14 ⁺ CD11b ⁺	0,790171	-0,444665	0,368430
Моноциты, экспрессирующие CD11c, % Monocytes with expression CD11c, % CD14 ⁺ CD11c ⁺	0,759375	-0,261236	0,353490
Моноциты, экспрессирующие CD11c, 10 ⁹ /л Monocytes with expression CD11c, 10 ⁹ /l CD14 ⁺ CD11c ⁺	0,825247	-0,415198	0,303720
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	-0,668867	-0,711788	-0,082581
Лимфоциты, 10 ⁹ /л Lymphocytes, 10 ⁹ /l	0,402819	-0,843726	-0,076662
НК-клетки, % NK cells, % CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,420290	-0,413710	-0,774879
НК-клетки, 10 ⁹ /л NK cells, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,533824	-0,551626	-0,628192
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, % NK cells with expression CD11b, % CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺	-0,586404	-0,217442	0,528792
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, 10 ⁹ /л NK cells with expression CD11b, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺	0,515023	-0,564550	-0,630123
Expl. Var.	9,271952	4,344381	2,690699
Prp. Totl.	0,487997	0,228652	0,141616

Примечание. Expl. Var. – дисперсия фактора; Prp. Totl. – доля дисперсии, приходящаяся на фактор.

Note. Expl. Var., the variance of the factor; Prp. Totl., the proportion of variance attributable to the factor.

ТАБЛИЦА 5. МАТРИЦА ФАКТОРНЫХ НАГРУЗОК ГРУППЫ № 2

TABLE 5. MATRIX OF FACTOR LOADS OF GROUP No. 2

Показатель Indicator	Фактор I Factor I	Фактор II Factor II	Фактор III Factor III
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /l	-0,320224	0,921317	0,184065
Гранулоциты, % Granulocytes, %	0,766649	0,612563	0,129086
Гранулоциты, 10 ⁹ /л Granulocytes, 10 ⁹ /l	0,168041	0,967177	0,161253
Гранулоциты, экспрессирующие CD11b, % Granulocytes with expression CD11b, % CD14 ⁺ CD13 ^{low} CD11b ⁺	-0,226032	0,197884	-0,873781
Гранулоциты, экспрессирующие CD11b, 10 ⁹ /л Granulocytes with expression CD11b, 10 ⁹ /l CD14 ⁺ CD13 ^{low} CD11b ⁺	0,166952	0,969343	0,146162
Гранулоциты, экспрессирующие CD11c, % Granulocytes with expression CD11c, % CD14 ⁺ CD13 ^{low} CD11c ⁺	-0,726888	-0,368881	0,239617
Гранулоциты, экспрессирующие CD11c, 10 ⁹ /л Granulocytes with expression CD11c, 10 ⁹ /l CD14 ⁺ CD13 ^{low} CD11c ⁺	-0,666509	0,388014	0,225185
Моноциты, % Monocytes, %	-0,778951	-0,287495	-0,305106
Моноциты, 10 ⁹ /л Monocytes, 10 ⁹ /l	-0,726120	0,670813	0,080474
Моноциты, экспрессирующие CD11b, % Monocytes with expression CD11b, % CD14 ⁺ CD11b ⁺	-0,208020	0,762658	0,084082
Моноциты, экспрессирующие CD11b, 10 ⁹ /л Monocytes with expression CD11b, 10 ⁹ /l CD14 ⁺ CD11b ⁺	-0,702698	0,699417	0,032450
Моноциты, экспрессирующие CD11c, % Monocytes with expression CD11c, % CD14 ⁺ CD11c ⁺	-0,856653	-0,235211	0,009195
Моноциты, экспрессирующие CD11c, 10 ⁹ /л Monocytes with expression CD11c, 10 ⁹ /l CD14 ⁺ CD11c ⁺	-0,875743	0,399970	0,117435
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	-0,802713	-0,587396	-0,061036
Лимфоциты, 10 ⁹ /л Lymphocytes, 10 ⁹ /l	-0,946877	0,249046	0,176792
НК-клетки, % NK cells, % CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,502459	-0,466269	0,725407
НК-клетки, 10 ⁹ /л NK cells, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	-0,501276	-0,453353	0,694440
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, % NK cells with expression CD11b, % CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺	-0,822438	-0,106321	-0,463170
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, 10 ⁹ /л NK cells with expression CD11b, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺	-0,793768	-0,355512	0,342517
Expl. Var.	8,293086	6,211364	2,466377
Prp. Totl.	0,436478	0,326914	0,129809

Примечание. См. примечание к таблице 4.

Note. As for Table 4.

ТАБЛИЦА 6. МАТРИЦА ФАКТОРНЫХ НАГРУЗОК ГРУППЫ № 3

TABLE 6. MATRIX OF FACTOR LOADS OF GROUP No. 3

Показатель Indicator	Фактор I Factor I	Фактор II Factor II	Фактор III Factor III
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /l	-0,946701	0,262409	0,108530
Гранулоциты, % Granulocytes, %	-0,216635	-0,563583	0,772597
Гранулоциты, 10 ⁹ /л Granulocytes, 10 ⁹ /l	-0,942162	0,109856	0,290751
Гранулоциты, экспрессирующие CD11b, % Granulocytes with expression CD11b, % CD14 ⁻ CD13 ^{low} CD11b ⁺	0,090610	0,660584	0,143925
Гранулоциты, экспрессирующие CD11b, 10 ⁹ /л Granulocytes with expression CD11b, 10 ⁹ /l CD14 ⁻ CD13 ^{low} CD11b ⁺	-0,936242	0,127661	0,297024
Гранулоциты, экспрессирующие CD11c, % Granulocytes with expression CD11c, % CD14 ⁻ CD13 ^{low} CD11c ⁺	-0,137750	0,223490	0,073343
Гранулоциты, экспрессирующие CD11c, 10 ⁹ /л Granulocytes with expression CD11c, 10 ⁹ /l CD14 ⁻ CD13 ^{low} CD11c ⁺	-0,814698	0,216567	0,239272
Моноциты, % Monocytes, %	-0,285170	-0,395879	-0,767995
Моноциты, 10 ⁹ /л Monocytes, 10 ⁹ /l	-0,977183	0,145693	-0,085468
Моноциты, экспрессирующие CD11b, % Monocytes with expression CD11b, % CD14 ⁺ CD11b ⁺	0,257396	0,712418	0,546492
Моноциты, экспрессирующие CD11b, 10 ⁹ /л Monocytes with expression CD11b, 10 ⁹ /l CD14 ⁺ CD11b ⁺	-0,963397	0,175472	-0,147799
Моноциты, экспрессирующие CD11c, % Monocytes with expression CD11c, % CD14 ⁺ CD11c ⁺	0,289797	-0,833871	0,314840
Моноциты, экспрессирующие CD11c, 10 ⁹ /л Monocytes with expression CD11c, 10 ⁹ /l CD14 ⁺ CD11c ⁺	-0,293487	-0,852038	0,141470
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	0,625698	0,441294	-0,541394
Лимфоциты, 10 ⁹ /л Lymphocytes, 10 ⁹ /l	-0,723915	0,543098	-0,151411
НК-клетки, % NK cells, % CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	-0,685348	-0,506548	-0,229669
НК-клетки, 10 ⁹ /л NK cells, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	-0,943841	-0,151096	-0,172251
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, % NK cells with expression CD11b, % CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺	-0,228565	-0,150637	-0,402185
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, 10 ⁹ /л NK cells with expression CD11b, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺	-0,969408	-0,099342	-0,202255
Expl. Var.	8,867103	3,887333	2,502656
Prp. Totl.	0,466690	0,204596	0,131719

Примечание. См. примечание к таблице 4.

Note. As for Table 4.

сирующих интегрин альфа-X, было наибольшим у больных с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 9,5 лет до исследования: число этих клеток превосходило показатели здоровых людей на 16,7% ($p_{k-w} < 0,016$). Не исключается, что это являлось косвенным свидетельством снижения активности воспалительного процесса в этой группе, поскольку обратный процесс – понижение числа клеток, экспрессирующих интегрин – коррелирует с повышенной восприимчивостью к инфекции, нарушением воспалительных реакций [11]. Необходимо отметить, что CD11b и CD11c могут конкурентно связываться с одним лигандом, весте с тем, появляются свидетельства, не исключающие сотрудничества этих интегринов в реализации патологических процессов [10].

Третья группа клеток, которая изучалась в данной работе – естественные киллеры (NK-клетки). Их пул (табл. 3), так же как и общее количество лимфоцитов, был снижен почти в 2 раза у больных с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 0,5 года до исследования (в сравнении с контрольной группой, $p_{k-w} < 0,016$). Сходные изменения уже наблюдались нами ранее [1], однако у больных с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 9,5 лет до исследования количество NK-клеток не отличалось от группы здоровых людей, что представляет новые данные этой работы.

Популяция NK-клеток, экспрессирующих CD11b, была снижена в той же когорте – у больных с туберкулемами легких, выявленными в среднем за 0,5 года до исследования. В сравнении с числом CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD11b⁺-клеток в контрольной группе их количество достигало величины только 78,3% ($p_{k-w} < 0,016$). Данные изменения также могут свидетельствовать о большей выраженности патологического процесса в недавно обнаруженных туберкулемах.

Применение кластерного анализа в изучении полученных данных позволило обнаружить два непересекающихся подмножества лабораторных показателей: 62,96% из которых включило показатели экспрессии поверхностных интегринов и 37,04% – объединило относительные величины популяций нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов – ключевых изучаемых популяций клеток.

Применение факторного анализа в оценке исследованных лабораторных показателей позволило установить группы диагностических критериев, внесших наибольший вклад в суммарную дисперсию выявленных изменений (табл. 4, 5, 6). У больных с туберкулемами легких, которые были обнаружены за 0,5 года до исследования наибольший вклад внесли значения (табл. 5): относительного количества гранулоцитов, а также гранулоцитов, экспрессирующих CD11c, отно-

сительного и абсолютного количества лимфоцитов, относительного и абсолютного количества NK-клеток, экспрессирующих CD11b. У больных с туберкулемами легких, выявленными за 9,5 лет до исследования наиболее значимыми показателями оказались (табл. 6): общее количество лейкоцитов, абсолютное количество моноцитов и моноцитов, экспрессирующих CD11b. Сравнивая в целом состав факторов, определяющих наибольший вклад в клиническую картину изученных групп, можно отметить значительное сходство показателей групп № 1 и № 3 (табл. 4, 6), что дает основание полагать, что выявленные изменения у больных с туберкулемами, которые были диагностированы достаточно давно стремятся к уровню значений контрольной группы. Очевидно, что в этом случае можно считать, что длительно существующие туберкулемы приобретают черты «нормы» или стремятся к ней.

Заключение

Исследуя роль β_2 -интегринов помимо их влияния на нейтрофилы и Т-лимфоциты в части рекрутирования в очаг воспаления [11], можно полагать, что они играют важное значение в подержании туберкулезных гранулем.

Установлено, что снижение экспрессии CD11c на гранулоцитах – является общим признаком наличия туберкулем.

Отличительным для туберкулем легких, выявленных за 0,5 года до исследования стали увеличение общего числа гранулоцитов и гранулоцитов, экспрессирующих CD11b, снижение популяции лимфоцитов, NK-клеток и NK-клеток, экспрессирующих CD11c.

Характерными изменениями, наблюдаемыми при изучении периферической крови больных с туберкулемами легких, выявленными за 9,5 лет до исследования были: увеличение популяции лейкоцитов, общего числа моноцитов, а также моноцитов, экспрессирующих CD11b и CD11c.

Отмечено значительное сходство значений изученных лабораторных показателей больных с туберкулемами легких, выявленными за 9,5 лет до исследования и данными здоровых людей, что свидетельствует о том, что длительно существующие туберкулемы приобретают черты «нормы» или стремятся к ней.

Благодарности

Автор выражает благодарность учреждению, на клинической базе которого было выполнено исследование: Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии – филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России.

Список литературы / References

1. Бердюгина О.В., Ершова А.В. Функционально-метаболические особенности фагоцитов крови при разных формах туберкулезного воспалительного процесса легких // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 21-32. [Berdyugina O.V., Yershova A.V. Functional and metabolic features of blood phagocytes at different forms of tubercular inflammatory process of lungs. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 1, pp. 21-32. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-21-32.
2. Cassetta L., Baekkevold E.S., Brandau S., Bujko A., Cassatella M.A., Dorhoi A., Krieg C., Lin A., Loré K., Marini O., Pollard J.W., Roussel M., Scapini P., Umansky V., Adema G.J. Deciphering myeloid-derived suppressor cells: isolation and markers in humans, mice and non-human primates. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2019, Vol. 68, pp. 687-697.
3. Ernst J.D. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 1998, Vol. 66, no. 4, pp. 1277-1281.
4. Helming L., Gordon S. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends Cell Biol.*, 2009, Vol. 19, pp. 514-522.
5. Hyun Y., Choe Y.H., Park S.A., Kim M. LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) distinctly regulate neutrophil extravasation through hotspots I and II. *Exp. Mol. Med.*, 2019, Vol. 51, pp. 1-13.
6. Jawhara S., Pluskota E., Cao W., Plow E.F., Soloviev D.A. Distinct Effects of Integrins $\alpha X\beta 2$ and $\alpha M\beta 2$ on leukocyte subpopulations during inflammation and antimicrobial responses. *Infect. Immun.*, 2017, Vol. 85, no. 1, e00644-16. doi: 10.1128/IAI.00644-16.
7. Martino M., Lodi L., Galli L., Chiappini E. Immune response to *Mycobacterium tuberculosis*: A narrative review. *Front. Pediatr.*, 2019, Vol. 7, 350. doi: 10.3389/fped.2019.00350.
8. Norris B.A., Ernst J.D. Mononuclear cell dynamics in *M. tuberculosis* infection provide opportunities for therapeutic intervention. *PLOS Pathog.*, 2018, Vol. 14, no. 10, e1007154. doi: 10.1371/journal.ppat.1007154.
9. Podolnikova N.P., Kushchayeva Y.S., Wu Y., Faust J., Ugarova T.P. The role of integrins $\alpha M\beta 2$ (Mac-1, CD11b/CD18) and $\alpha D\beta 2$ (CD11d/CD18) in macrophage fusion. *Am. J. Pathol.*, 2016, Vol. 186, no. 8, pp. 2105-2116.
10. Sándor N., Lukácsi S., Ungai-Salánki R., Orgován N., Szabó B., Horváth R., Erdei A., Bajtay Z. CD11c/CD18 dominates adhesion of human monocytes, macrophages and dendritic cells over CD11b/CD18. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 9, e0163120. doi: 10.1371/journal.pone.0163120.
11. Schittenhelm L., Hilkens C.M., Morrison V.L. $\beta 2$ Integrins as regulators of dendritic cell, monocyte, and macrophage function. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1866. doi: 10.3389/fimmu.2017.01866.
12. Schreiber H.A., Harding J.S., Hunt O., Altamirano C.J., Hulseberg P.D., Stewart D., Fabry Z., Sandor M. Inflammatory dendritic cells migrate in and out of transplanted chronic mycobacterial granulomas in mice. *J. Clin. Invest.*, 2011, Vol. 121, no. 10, pp. 3902-3913.
13. Sia J.K., Rengarajan J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbiol. Spectr.*, 2019, Vol. 7, no. 4, 10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018.
14. Taylor J.L., Bielefeldt-Ohmann H., Pozzi A., Izzo A.A. Lack of alpha-1 integrin alters lesion morphology during pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2008, Vol. 88, no. 5, pp. 444-452.
15. Xu S., Wang J., Wang J.H., Springer T.A. How integrins recognize complement iC3b. *PNAS*, 2017, Vol. 114, no. 13, pp. 3403-3408. doi: 10.1073/pnas.1620881114.

Автор:

Бердюгина О.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Author:

Berdyugina O.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 25.06.2020
Принята к печати 13.07.2020

Received 25.06.2020
Accepted 13.07.2020

НЕЙРОИММУННЫЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В МОЧЕВОМ ПУЗЫРЕ ПРИ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОМ ЦИСТИТЕ/СИНДРОМЕ БОЛЕЗНЕННОГО МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Шолан Р.Ф.

Республиканский лечебно-диагностический центр, г. Баку, Азербайджанская Республика

Резюме. Цель исследования – изучение особенностей взаимоотношений цитокинов, тучных клеток и фактора роста нервов (NGF) у пациентов с интерстициальным циститом/синдромом болезненного мочевого пузыря (ИЦ/СБМП). Обследовано 68 женщин с клинически диагностированным ИЦ/СБМП, средний возраст $54,2 \pm 12,4$ лет. Концентрацию интерлейкинов – IL-1 β , IL-6, IL-8, фактора некроза опухоли- α (TNF α) и NGF в моче определяли методом ИФА. Тучные клетки идентифицированы в биоптатах слизистой оболочки мочевого пузыря, взятых в процессе цистоскопии. Статистическая обработка выполнена в программе Statistica в Microsoft Excel. Рассчитан коэффициент корреляции Пирсона. В зависимости от типа ИЦ/СБМП пациенты были разделены на 2 группы: I группа – 36 пациентов с классическим типом заболевания; II группа – 32 пациента с незлепленным типом ИЦ/СБМП. Существенных различий между группами не отмечалось. У 13,9% пациентов I группы появление клинических проявлений заболевания наблюдалось в возрасте младше 40 лет, во II группе на появление симптомов заболевания в этом возрасте указали 28,1% обследованных. У пациенток I группы уровень IL-1 β в сравнении с показателем группы контроля был выше в 2,4 раза ($p < 0,05$), уровни IL-6, IL-8 и TNF α превышали контрольный в 2,0 ($p < 0,05$), в 2,5 ($p < 0,05$) и в 2,0 раза ($p < 0,05$) соответственно. У пациенток II группы содержание IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF α было в 2,4 ($p < 0,05$), в 2,0 ($p < 0,05$), в 2,0 ($p < 0,05$) и в 1,9 ($p < 0,05$) раза выше, чем в группе контроля соответственно. Между I и II группами существенные различия в уровне IL-1 β , IL-6 и TNF α практически отсутствовали, лишь концентрация IL-8 у женщин I группы была на 20,3% выше, чем во II группе. Уровень NGF в моче у женщин с ИЦ/СБМП превышал контрольный уровень в 1,6 раза ($p < 0,05$) в I группе и в 1,5 раза ($p < 0,05$) – во II группе. Число тучных клеток у пациенток I группы было значительно выше, чем в группе контроля и во II группе – в 1,6 ($p < 0,05$) и в 1,4 раза ($p < 0,05$) соответственно. Между показателями отмечалась, в основном, прямая слабая корреляционная связь, лишь в I группе между IL-1 β и тучными клетками выявлялась средняя корреляционная связь ($r = +0,508$). Определение цитокинов – позволяет мониторировать активацию воспалительных клеток в ткани мочевого пузыря и создает возможность для разработки стратегий диагностики. Увеличение количества тучных клеток может указывать на важность этих клеток в прогрессировании заболевания, а наличие повышенного уровня NGF в моче позволяет предположить, что ИЦ/СБМП может быть вызвано хроническим воспалением.

Ключевые слова: интерстициальный цистит, синдром болезненного мочевого пузыря, цитокины, тучные клетки, фактор роста нервов, моча, биоптат, воспаление

Адрес для переписки:

Шолан Рашад Фархад оглы
Республиканский лечебно-диагностический центр
AZ1122, Азербайджан, г. Баку, Тбилисский пр., 147.
Тел.: 8 (99450) 424-92-50.
E-mail: ittihaf@yahoo.com

Address for correspondence:

Sholan Rashad F.
Republican Medical Diagnostic Center
AZ1122, Azerbaijan, Baku, Tbilissky ave., 147.
Phone: 7 (99450) 424-92-50.
E-mail: ittihaf@yahoo.com

Образец цитирования:

Р.Ф. Шолан «Нейроиммунные межклеточные взаимоотношения в мочевом пузыре при интерстициальном цистите/синдроме болезненного мочевого пузыря» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 879-886.
doi: 10.15789/1563-0625-RBU-2001

© Шолан Р.Ф., 2020

For citation:

R.F. Sholan "Relationships between urinary neural and immune factors in the patients with interstitial cystitis/bladder painful syndrome", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 879-886.
doi: 10.15789/1563-0625-RBU-2001

DOI: 10.15789/1563-0625-RBU-2001

RELATIONSHIPS BETWEEN URINARY NEURAL AND IMMUNE FACTORS IN THE PATIENTS WITH INTERSTITIAL CYSTITIS/BLADDER PAINFUL SYNDROME

Sholan R.F.

Republican Medical Diagnostic Center, Baku, Republic of Azerbaijan

Abstract. The purpose of this work was to study the relationships between urinary cytokines, mast cells and nerve growth factor (NGF) in the patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS). Sixty-eight women with clinically diagnosed IC/BPS were under study. Their mean age was 54.2 ± 12.4 years. Urinary concentrations of interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF α), and NGF were determined by ELISA technique. Mast cells were identified in biopsies of mucous membranes from urinary bladder harvested during cystoscopy. Statistical evaluation was performed by Statistica program in Microsoft Excel. Pearson correlation quotients were calculated. Depending on the type of IC/BPS, the patients were divided into 2 groups: group I included 36 patients with classic type of disease; group II comprised 32 patients with non-ulcer type of IC/BPS. No significant differences were revealed between the groups. In 13.9% of patients from group I, the onset of clinical manifestations of the disease was observed at the age of less than 40 years; in group II, 28.1% of the examined mentioned appearance of the disease symptoms at this age. The levels of IL-1 β in the patients from group I was 2.4 times higher than in controls ($p < 0.05$). IL-6, IL-8 and TNF α concentrations exceeded control values by 2.0 ($p < 0.05$), 2.5 ($p < 0.05$) and 2.0 times ($p < 0.05$), respectively. In the patients from group II, the content of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF α was 2.4 ($p < 0.05$), 2.0 ($p < 0.05$), 2.0 ($p < 0.05$) and 1.9 ($p < 0.05$) times higher than in the control group, respectively. There were no significant differences between groups I and II, in IL-1 β , IL-6, and TNF α levels, except of IL-8 in women of group I that was 20.3% higher than in group II. The urinary NGF level in the patients with IC/BPS exceeded the control level 1.6 times ($p < 0.05$) for group I, and 1.5 times ($p < 0.05$) for group II. The number of mast cells in the patients of group I was significantly higher than in controls and in group II, i.e., 1.6 ($p < 0.05$) and 1.4 times ($p < 0.05$), respectively. In most cases, a direct weak correlation was revealed between the indices. Only in group I, a moderate correlation ($r = + 0.508$) could be detected between IL-1 β and mast cells. Determination of cytokine levels allows to detect activation of inflammatory cells in bladder tissue and provides an opportunity for developing diagnostic strategies. Increased numbers of mast cells may indicate the importance of these cells in the disease progression, whereas elevated levels of NGF in urine suggests that IC/BPS may be caused by chronic inflammation.

Keywords: interstitial cystitis, bladder pain syndrome, cytokines, mast cells, nerve growth factor, urine, biopsy, inflammation

Введение

Интерстициальный цистит/синдром болезненного мочевого пузыря (ИЦ/СБМП) – хроническое воспалительное заболевание мочевого пузыря неизвестной этиологии. Заболевание часто встречается у женщин, доля которых составляет 80-90% [1, 3, 4, 9]. Было предложено несколько гипотез об этиологии и патогенезе ИЦ/СБМП. Согласно одной из гипотез, хроническое воспаление и иммунная система, вероятно, играют важную роль в его развитии [8, 13]. В пользу этой гипотезы свидетельствует то, что ИЦ/СБМП имеет аутоиммунный компонент из-за повышенной распространенности некоторых аутоиммунных состояний у пациентов. Гистология мочевого пузыря, показывающая инфильтраты тучных клеток, эозинофильных лейкоцитов и Т-лимфоцитов, позволяет предположить, что за-

болевание опосредовано иммунной системой [9, 15].

Интерстициальный цистит рассматривается как гетерогенный синдром с двумя различными формами: неязвенная и классическая форма интерстициального цистита с поражениями Гуннера (тип 3С по классификации ESSIC). Исследования с использованием массивов экспрессии генов для ИЦ/СБМП с поражениями Гуннера выявили характерные иммунные реакции и аномалии уротелия [19, 21]. У пациентов с ИЦ/СБМП в моче и сыворотке крови наблюдались повышенные уровни различных провоспалительных цитокинов [11], а в образцах тканей – повышенная иммунная активность клеток и аберрации [17].

Вместе с тем продолжается изучение клеточных механизмов воспаления и процессов, которые повреждают ткани и приводят к фиброзу [2]. Выявление и характеристика прогностического

биомаркера мочи или сыворотки для диагностики ИЦ/СБМП было бы большим достижением. Однако гетерогенность синдрома делает это маловероятным, поскольку один биомаркер не может охватить весь спектр.

В настоящее время проводятся исследования по изучению роли различных компонентов клеточного инфильтрата, который пока еще недостаточно охарактеризован. Например, исследования показывают, что Т- и В-клетки связаны с различными клиническими признаками ИЦ и существуют различия в популяциях лимфоцитов при классическом и неязвенном ИЦ/СБМП. Особый интерес посвящен тучной клетке, которая, как предполагается, является основным участником в этом заболевании, включая диагностику, развитие симптомов и связь с фиброзом детрузора. Тучные клетки могут быть активированы различными агентами, что приводит к высвобождению ряда различных медиаторов воспаления. Как эти дифференциальные ответы тучных клеток контролируются, все еще не установлено [5]. В экспериментальных исследованиях показано, что выработку активности выживания аутокринных тучных клеток повышает фактор роста нервов (NGF), выживаемость которого зависит от плотности клеток [7].

Полагают, что при ИЦ/СБМП существует сложная природа передачи сигналов цитокинов: несколько цитокинов могут иметь перекрывающиеся функции и биологические эффекты, и один и тот же цитокин может вызывать множественные нисходящие ответы [14]. Цитокины являются потенциальными кандидатами на аутокринные факторы выживания. В эксперименте в тучных клетках NGF вызывал увеличение количества РНК-мессенджеров для интерлейкина (IL) IL-3, IL-4, IL-10, фактора некроза опухолей-альфа (TNF α) [16].

Таким образом, профили цитокинов у пациентов с ИЦ/СБМП могут быть использованы для идентификации типов клеток, участвующих в патогенезе заболевания. Изучение причины и следствия различных клеточных реакций стенки мочевого пузыря необходимо для того, чтобы показать природу различных фенотипов ИЦ/СБМП, особенно это относится к типу болезни Гуннера со всеми его характерными признаками.

Цель данного исследования заключалась в изучении особенностей взаимоотношений цитокинов, тучных клеток и NGF у пациентов с ИЦ/СБМП.

Материалы и методы

При проведении исследования руководствовались принципами Хельсинкской декларации

Всемирной медицинской ассоциации «Рекомендации для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей» [23]. У принявших участие в исследовании получено информированное согласие.

В исследовании приняли участие 68 женщин с клинически диагностированным ИЦ/СБМП. Диагноз ИЦ/СБМП поставлен с учетом критериев NIDDK (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease) [12]. Критериями включения в исследование были: классический и неязвенный типы ИЦ/СБМП, отсутствие сахарного диабета, артрита, системной красной волчанки. Критериями исключения были: наличие нейрогенного поражения, инфекции мочевыводящих путей. В группе контроля обследованные не имели в анамнезе ИЦ/СБМП и болезни нижних мочевых путей.

Пациенты были в возрасте от 21 до 67 лет, средний возраст $54,2 \pm 12,4$ лет. В группу контроля вошли 20 женщин, возраст которых колебался в интервале 17-53 лет, средний возраст составил $35,3 \pm 9,7$ лет.

Для определения концентрации интерлейкинов – IL-1 β , IL-6, IL-8, фактора некроза опухоли- α (TNF α) в моче утреннюю, первую порцию мочи собирали в стерильную пластиковую посуду с крышкой. Для измерения использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) реактивами фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Тучные клетки идентифицированы в биоптатах слизистой оболочке мочевого пузыря, взятых в процессе цистоскопии. Цистоскопия с биопсией мочевого пузыря выполнена эндоскопами фирмы Olympus (Япония) с оптикой 30 и 70 градусов. В качестве местной анестезии и для снижения риска инфекционно-воспалительных осложнений трансуретрально был введен гель, в состав которого входили лидокаин и хлоргексидин, внутримышечно с гемостатической целью введен раствор этамзилат натрия 250 мг. Биоптаты помещали в 10% раствор буферизованного формалина, после заливки парафином и получения парафиновых белков. С помощью микротомы готовили срезы толщиной 4 мкм, после чего, для оценки тучных клеток, образцы окрашивали толуидиновым синим. Для просмотра микропрепаратов использовали световой микроскоп Olympus Vx 50 и систему камер Olympus PM10SP. Каждое поперечное сечение было разделено на 10 участков, в каждом из которых подсчитывали тучные клетки с помощью следующей шкалы: 0 – нет тучных клеток; 1 – менее 20 тучных клеток; 2 – 20-45 тучных клеток; 3 – более 45 тучных клеток. Баллы всех 10 срезов складывали, делили на 30 (максимально возможный балл) и умножали на 100. Подсчет тучных клеток прово-

дили при оптическом увеличении 200 [6]. Фактор роста нервов (NGF) определяли в моче. Образцы мочи центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 мин при 4 °С, после чего супернатант отливали в пробирки Эппендорфа и хранили при -80 °С. Определение проводили методом ИФА с помощью набора NGF Emax® на аппарате Medispec 6000M (Израиль).

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с использованием программного обеспечения Statistica в Microsoft Excel release 6 (StatSoft, США). Показатели были выражены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (SD), а также в виде чисел и процентов. Рассчитан коэффициент корреляции Пирсона. Статистические оценки считались значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты

В зависимости от типа ИЦ/СБМП пациенты были разделены на 2 группы: I группа – 36 пациентов с классическим типом заболевания (тип 3 С); II группа – 32 пациента с неязвенным типом ИЦ/СБМП. Общая характеристика пациентов приведена в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, существенных различий между группами не отмечалось. В обеих группах у женщин превалировал возраст пременопаузы

и менопаузы. Вместе с тем у 13,9% пациентов I группы появление клинических проявлений заболевания наблюдалось в возрасте младше 40 лет, тогда как во II группе на появление симптомов заболевания в этом возрасте указали 28,1% обследованных.

Результаты определения цитокинов, NGF в моче и тучных клеток в биоптатах мочевого пузыря представлены в таблице 2.

Согласно полученным данным, концентрация исследованных цитокинов в моче у пациенток обеих групп статистически значимо превышала контрольные величины. У пациенток с Гуннеровскими поражениями (I группа) уровень IL-1β в сравнении с показателем группы контроля был выше в 2,4 раза ($p < 0,05$), уровни IL-6, IL-8 и TNFα превышали контрольный в 2,0 ($p < 0,05$), в 2,5 ($p < 0,05$) и в 2,0 раза ($p < 0,05$) соответственно. У пациенток без Гуннеровских поражений (II группа) содержание IL-1β, IL-6, IL-8 и TNFα было в 2,4 ($p < 0,05$), в 2,0 ($p < 0,05$), в 2,0 ($p < 0,05$) и в 1,9 ($p < 0,05$) раза выше, чем в группе контроля, соответственно. По данным сравнительного анализа, между I и II группами существенные различия в уровне IL-1β, IL-6 и TNFα практически отсутствовали, лишь концентрация IL-8 у женщин I группы была на 20,3% выше, чем во II группе. Уровень NGF в моче у

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОК ГРУПП ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS OF RESEARCH GROUP

Показатель Index	I группа Group I (n = 36)	II группа Group II (n = 32)	p
Средний возраст, лет Average age, years	52,90±4,02	48,10±5,11	0,068
Возраст 17-44 лет, n/% Age 17-44 years old, n/%	17/47,2	12/37,5	0,057
45-67 лет, n/% Age 45-67 years old, n/%	19/52,8	20/62,5	0,063
Возраст начала заболевания, лет Age at the onset of disease, years			
≤ 40	5/13,9	9/28,1	0,050
41-60	14/38,9	11/34,4	0,077
≥ 61	17/47,2	12/37,5	0,055
Частота мочеиспускания в день, n/% Urination frequency per day, n/%			
7-10	7/19,4	8/25,0	0,053
11-18	23/63,9	17/53,1	0,056
≥ 19	6/16,7	7/21,9	0,051
Максимальный объем мочевого пузыря, мл Maximum volume of the bladder, ml			
≤ 350	4/11,1	4/12,5	0,070
351-450	24/66,7	21/65,6	0,077
> 450	8/22,2	7/21,9	0,081

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ, NGF В МОЧЕ И ЧИСЛО ТУЧНЫХ КЛЕТОК В БИОПТАТАХ

TABLE 2. LEVEL OF CYTOKINES, NGF IN THE URINE AND THE NUMBER OF MAST CELLS IN BIOPSIES

Показатель Index	I группа Group I (n = 36)	II группа Group II (n = 32)	Контрольная группа Control group (n = 20)
IL-1β , пг/мл IL-1 β , pg/ml	88,6 \pm 5,10*	90,2 \pm 3,56*	36,90 \pm 1,34
IL-6 , пг/мл IL-6, pg/ml	78,3 \pm 3,18*	77,7 \pm 3,65*	38,70 \pm 1,62
IL-8 , пг/мл IL-8, pg/ml	3,84 \pm 1,04*	3,06 \pm 0,93*	1,55 \pm 0,41
TNFα , пг/мл TNF α , pg/ml	79,10 \pm 3,34*	76,40 \pm 4,02*	39,40 \pm 4,17
NGF , нг/мл NGF, ng/ml	139,90 \pm 28,39*	130,90 \pm 20,11*	87,70 \pm 12,98
Тучные клетки Mast cells	122,10 \pm 23,17*,**	87,6 \pm 16,2	78,00 \pm 6,12

Примечание. * – статистическая значимость различий с контрольной группой; ** – статистическая значимость различий между I и II группами ($p < 0,05$).

Note. *, statistical significance of differences with control group; **, statistical significance of differences between groups I and II ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 3. КОЭФФИЦИЕНТ КОРРЕЛЯЦИИ (r) МЕЖДУ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЦИТОКИНАМИ, ТУЧНЫМИ КЛЕТКАМИ И NGF В ОБРАЗЦАХ МОЧИ У ПАЦИЕНТОВ ИССЛЕДОВАННЫХ ГРУПП

TABLE 3. CORRELATION COEFFICIENT (r) BETWEEN PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES, MAST CELLS AND NGF IN URINE SAMPLES IN PATIENTS OF THE STUDIED GROUPS

Пары корреляции Correlation pairs	I группа Group I (n = 36)	II группа Group II (n = 32)	Контрольная группа Control group (n = 20)
IL-1β – тучные клетки IL-1 β – mast cells	+0,508	+0,313	+0,024
IL-6 – тучные клетки IL-6 – mast cells	+0,362	+0,317	+0,118
IL-8 – тучные клетки IL-8 – mast cells	+0,275	+0,210	-0,221
TNFα – тучные клетки TNF α – mast cells	+0,314	+0,292	+0,101
IL-1β – NGF	+0,307	+0,266	-0,122
IL-6 – NGF	+0,311	+0,401	-0,107
IL-8 – NGF	+0,277	+0,158	-0,116
TNFα – NGF	-0,108	-0,200	+0,144
NGF – тучные клетки NGF – mast cells	+0,180	+0,178	-0,013

женщин с ИЦ/СБМП превышал контрольный уровень в 1,6 раза ($p < 0,05$) в I группе и в 1,5 раза ($p < 0,05$) – во II группе. Число тучных клеток у пациенток I группы было значительно выше, чем в группе контроля и во II группе – в 1,6 ($p < 0,05$) и в 1,4 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Исходя из того, что цитокины и тучные клетки участвуют в регуляции иммунитета, а также то, что они связаны с NGF, мы проанализировали взаимосвязь между этими показателями в группах исследования (табл. 3). Как следует из таблицы 3, между показателями отмечалась, в основном, прямая слабая корреляционная связь, лишь в I группе между IL-1 β и тучными клетками выявлялась средняя корреляционная связь ($r = +0,508$). Очень слабая взаимосвязь наблюдалась между IL-8 и тучными клетками, IL-8- NGF, TNF α – NGF и NGF – тучные клетки у пациентов с классическим ИЦ/СБМП. Во II группе исследования очень слабая корреляция отмечалась между IL8 и тучными клетками, TNF α и тучными клетками, IL-1 β и NGF, а также между IL-8 – NGF, TNF α – NGF, NGF и тучные клетки.

Обсуждение

Считается, что пациенты с поражением Гуннера клинически и патологически отличаются от пациентов с синдромом болевого синдрома без поражения Гуннера. Распространенность поражения Гуннера составляет 5-57% [22]. Данным показателям соответствуют результаты нашего исследования: пациентки с Гуннеровскими поражениями составили 52,9%. В группе с этой патологией начало заболевания чаще отмечалось в пожилом возрасте, что по сравнению с группой пациентов без Гуннеровских поражений было на 20,6% чаще.

Согласно полученным нами данным, у пациенток с Гуннеровскими поражениями и без них, экспрессия провоспалительных цитокинов была статистически значимо увеличена по сравнению с контрольной группой. Различие между группами отмечалось лишь в отношении концентрации IL-8, концентрация которого была выше у пациенток с язвенным типом ИЦ/СБМП. Наши результаты согласуются с данными литературы, в которых сообщается, что уровни IL-8 в моче (CXCL-8) были способны различать язвенный и неязвенный ИЦ/СБМП [5, 20]. Используя мультиплексные анализы на основе антител, авторы сообщили, что уровень CXCL-8 повышается вместе с другими показателями семейства хемокинов CXС, а именно CXCL-1 и CXCL-10, в моче пациентов с язвенной ИЦ/СБМП [20]. По данным проведенного нами исследования, уровень IL-8 в моче положительно коррелировал с количеством тучных клеток и уровнем NFG в обеих группах.

О положительной связи между количеством IL-8 в моче и количеством тучных клеток мочевого пузыря у пациентов с ИЦ/СБМП также сообщили D.R. Erickson и соавт. [10].

Повышенный уровень провоспалительных цитокинов в образцах мочи как у пациентов с Гуннеровским ИЦ/СБМП, так и у пациентов с неязвенным ИЦ/СБМП свидетельствовал о воспалении, при котором также выделялись IL-1 β , TNF α и IL-6. При этом значительное воспаление было индуцировано у пациентов с Гуннеровскими поражениями ИЦ/СБМП по сравнению с пациентами с неязвенным ИЦ/СБМП, поскольку число тучных клеток было значительно увеличено у пациентов с Гуннеровскими поражениями, в отличие от пациентов с неязвенным ИЦ/СБМП и с контрольной группой.

Заметим, что уровень IL-6 в образцах мочи положительно коррелировал как с тучными клетками, так и с NGF, причем у пациентов с Гуннеровскими поражениями значение коэффициента корреляции ($r = +0,362$ и $r = +0,311$ соответственно) было выше, чем коэффициенты корреляции других провоспалительных цитокинов с тучными клетками и NGF. Мы связываем это не только с выработкой IL-6 клетками иммунной системы и клетками, которые выполняют иммунную функцию, но и с его влиянием на дифференцировку нервных клеток [18].

На данный момент результаты по плотности тучных клеток у пациенток с ИЦ/СБМП являются спорными, и поэтому считается необходимым проведение дальнейших исследований. Наши исследования показали статистически значимо повышенное число тучных клеток в стенке мочевого пузыря у пациенток с Гуннеровскими поражениями по сравнению с показателями группы с неязвенным ИЦ/СБМП и группой контроля. Установлено, что тучные клетки – это часть иммунной системы, и находятся они в соединительной ткани. Также тучные клетки были найдены в органах и тканях кровеносной и нервной систем. Они представляют собой гематопозитические клетки и потенциальные источники широкого разнообразия биологически активных секретиремых продуктов, включая различные цитокины и факторы роста [22]. Можно предположить, что активация тучных клеток происходит в результате повреждения эпителия мочевого пузыря вредными химическими веществами в моче, которые обнаруживаются Т-лимфоцитами и сигналы передаются и активируют тучные клетки, являющиеся участниками в воспалительном процессе, и выделяющие цитокины. Этот опосредованный тучными клетками воспалительный процесс стимулирует ноцицептивные афферентные нервы С-волокна, вызывая боль в мочевом пузыре [17].

Уровень NGF в образцах мочи у пациентов с ИЦ/СБМП были значительно выше, чем у обследованных группы контроля ($p < 0,05$). Повышенное содержание NGF свидетельствовало о вовлечении воспаления в патогенез заболевания. Установлено, что NGF играет значительную роль в выживаемости нейронов, его содержание повышается на воспалительных участках одновременно с ростом числа тучных клеток. Он оказывает воздействие на дифференцировку и выделение медиаторов, в основном клетками воспаления и поэтому расценивается как модулятор воспаления и ремоделирования. NGF представляется как фактор дифференцировки тучных клеток, влияет на их выживаемость и функционирование. Показано, что все эффекты NGF иллюстрируют его роль в нейроиммунологических взаимоотношениях, и тучные клетки могут быть одной из наиболее важных популяций клеток, которые отвечают за это взаимодействие. NGF отвечает за увеличение числа именно тучных клеток, но не несет ответственности за пролиферацию и гипертрофию нервных клеток. Результаты исследований, представленных в литературе, позволяют полагать, что он является ведущим фактором выживаемости тучных клеток соединительной ткани и очень важной составляющей взаимоотношений между нервной, иммунной и эндокринной системами. По продукции TNF α тучные клетки, как самый мощный источник этого цитокина, практически

не имеет конкурентов [17, 22]. Следовательно, можно констатировать, что тучные клетки являются физиологическим фактором регуляции иммунного и нервного гомеостаза.

Таким образом, результаты данного исследования подтверждают вероятность того, что ИЦ/СБМП имеет многофакторную этиологию, которая может действовать преимущественно через один или несколько путей, приводящих к типичному симптомокомплексу.

Заключение

Результаты настоящего исследования показали, что уровни провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF α в моче могут быть связаны с патогенезом ИЦ/СБМП. Определение цитокинов – это удобный подход к мониторингу активации воспалительных клеток в ткани мочевого пузыря и создает возможность для разработки новых стратегий диагностики. Пациентки с Гуннеровским ИЦ/СБМП имели более высокое количество тучных клеток по сравнению с неязвенным типом заболевания и здоровой тканью. Увеличение количества тучных клеток может указывать на важность этих клеток в прогрессировании заболевания. Наличие повышенного уровня NGF в моче у пациенток с ИЦ/СБМП позволяет предположить, что это расстройство мочевого пузыря может быть вызвано хроническим воспалением.

Список литературы / References

1. Аль-Шукри С.Х., Кузьмин И.В., Слесаревская М.Н., Игнашов Ю.А. Симптоматика и цистоскопическая картина у женщин с синдромом болезненного мочевого пузыря // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, 2017. Т. 24, № 4. С. 50-54. [Al-Shukri S.H., Kuzmin I.V., Slesarevskaya M.N., Ignashov Yu.A. Symptoms and cystoscopic picture in women with painful bladder syndrome. *Uchenye zapiski Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta imeni akademika I.P. Pavlova = Scientific Notes of the St. Petersburg State I. Pavlov Medical University*, 2017, Vol. 24, no. 4, pp. 50-54. (In Russ.)]
2. Зайцев А.В., Шаров М.Н., Арефьева О.А., Пушкарь Д.Ю. Синдром болезненного мочевого пузыря / интерстициальный цистит: факторы прогноза клинического течения заболевания // Вестник урологии, 2018. Т. 6, № 3. С. 26-35. [Zaytsev A.V., Sharov M.N., Arefyeva O.A., Pushkar D.Yu. Bladder pain syndrome / interstitial cystitis: prognosis factors for the clinical course of the disease. *Vestnik urologii = Bulletin of Urology*, 2018, Vol. 6, no. 3, pp. 26-35. (In Russ.)]
3. Игнашов Ю.А., Кузьмин И.В., Слесаревская М.Н. Синдром Болезненного мочевого пузыря: исторические аспекты // Урологические ведомости, 2016. Т. 6, № 3. С. 5-10. [Ignashov Yu.A., Kuzmin I.V., Slesarevskaya M.N. Bladder pain syndrome: historical aspects. *Urologicheskie vedomosti = Urological Statements*, 2016, Vol. 6, no. 3, pp. 5-10. (In Russ.)]
4. Слесаревская М.Н., Игнашов Ю.А., Кузьмин И.В. Современные подходы к диагностике синдрома болезненного мочевого пузыря // Урологические ведомости, 2017. Т. 7, № 2. С. 25-30. [Slesarevskaya M.N., Ignashov Yu.A., Kuzmin I.V. Modern approaches to the diagnosis of painful bladder syndrome. *Urologicheskie vedomosti = Urological Statements*, 2017, Vol. 7, no. 2, pp. 25-30. (In Russ.)]
5. Argade S., Chermansky C., Tyagi P. Biomarkers for interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Womens Health (Lond.)*, 2016, Vol. 12, no. 1, pp. 87-90.
6. Bayrak O., Seckiner I., Solakhan M., Karakok M., Erturhan S.M., Yagci F. Effects of intravesical dexpanthenol use on lipid peroxidation and bladder histology in a chemical cystitis animal model. *Urology*, 2012, Vol. 79, pp. 1023-1026.

7. Bullock E.D., Johnson E.M. Nerve growth factor induces the expression of certain cytokine genes and bcl-2 in mast cells. Potential role in survival promotion. *J. Biol. Chem.*, 1996, Vol. 271, no. 44, pp. 27500-27508.
8. Diniz S., Dinis P., Cruz F., Pinto R. Bladder pain syndrome/interstitial cystitis: present and future treatment perspectives. *Minerva Urol. Nefrol.*, 2013, Vol. 65, no. 4, pp. 263-276.
9. Duh K., Funaro M.G., DeGouveia W., Bahlani S., Pappas D., Najjar S., Tabansky I., Moldwin R., Stern J.N.H. Crosstalk between the immune system and neural pathways in interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Discov. Med.*, 2018, Vol. 25, no. 139, pp. 243-250.
10. Erickson D.R., Tomaszewski J.E., Kunselman A.R., Stetter C.M., Peters K.M., Rovner E.S., Demers L.M., Wheeler M.A. Urine markers do not predict biopsy findings or presence of bladder ulcers in interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *J. Urol.*, 2008, Vol. 179, no. 5, pp. 1850-1856.
11. Furuta A., Yamamoto T., Suzuki Y., Gotoh M., Egawa S., Yoshimura N. Comparison of inflammatory urine markers in patients with interstitial cystitis and overactive bladder. *Int. Urogynecol. J.*, 2018, Vol. 29, pp. 961-966.
12. Gillenwater J.Y., Wein A.J. Summary of the National Institute of Arthritis, Diabetes and Kidney Diseases. Workshop on Interstitial Cystitis. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, August 28-29, 1987. *J. Urology*, 1988, Vol. 140, pp. 203-206.
13. Gonzalez E.J., Arms L., Vizzard M.A. The role(s) of cytokines/chemokines in urinary bladder inflammation and dysfunction. *Biomed Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 120525. doi: 10.1155/2014/120525.
14. Han L., Yang J., Wang X., Li D., Lv L., Li B. Th17 cells in autoimmune diseases. *Front. Med.*, 2015, Vol. 9, no. 1, pp. 10-19.
15. Keller J.J., Chen Y.K., Lin H.C. Comorbidities of bladder pain syndrome/interstitial cystitis: a population-based study. *BJU Int.*, 2012, Vol. 110, no. 11, Pt C, pp. E903-E909.
16. Kritas S.K., Caraffa A., Antinolfi P., Saggini A., Pantalone A., Rosati M., Tei M., Speziali A., Saggini R., Pandolfi F., Cerulli G., Conti P. Nerve growth factor interactions with mast cells. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2014, Vol. 27, no. 1, pp. 15-19.
17. Maeda D., Akiyama Y., Morikawa T., Kunita A., Ota Y., Katoh H., Niimi A., Nomiya A., Ishikawa S., Goto A., Igawa Y., Fukayama M., Homma Y. Hunner-type (classic) interstitial cystitis: a distinct inflammatory disorder characterized by pancystitis, with frequent expansion of clonal B-cells and epithelial denudation. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, Iss. 11, pp. e0143316. doi: 10.1371/journal.pone.0143316.
18. Papanicolaou D.A., Wilder R.L., Manolagas S.C., Chrousos G.P. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann. Intern. Med.*, 1998, Vol. 128, no. 2, pp. 127-137.
19. Proaño A., Garde G., Garrido G., Mazza O. ESSIC criteria for the diagnosis of bladder pain syndrome/interstitial cystitis (BPS/IC) and comparison with the NIDDK criteria. *Arch. Esp. Urol.*, 2013, Vol. 66, no. 2, pp. 206-214.
20. Tyagi P., Killinger K., Tyagi V., Nirmal J., Chancellor M., Peters K.M. Urinary chemokines as noninvasive predictors of ulcerative interstitial cystitis. *J. Urol.*, 2012, Vol. 187, no. 6, pp. 2243-2248.
21. van de Merwe J.P., Nordling J., Bouchelouche P., Bouchelouche K., Cervigni M., Daha L.K., Elneil S., Fall M., Hohlbrugger G., Irwin P., Mortensen S., van Ophoven A., Osborne J.L., Peekker R., Richter B., Riedl C., Sairanen J., Tinzl M., Wyndaele J.J. Diagnostic criteria, classification, and nomenclature for painful bladder syndrome/interstitial cystitis: an ESSIC proposal. *Eur. Urol.*, 2008, Vol. 53, pp. 60-67.
22. Whitmore K.E., Fall M., Sengiku A., Tomoe H., Logadottir Y., Kim Y.H. Hunner lesion versus non-Hunner lesion interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Int. J. Urol.*, 2019, Vol. 26, Iss. S1, pp. 26-34.
23. World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*, 2013, Vol. 310, no. 20, pp. 2191-2194.

Автор:

Шолан Рашид Фархад оглы — к.м.н., заведующий отделением «Почечные болезни и трансплантология», Республиканский лечебно-диагностический центр, г. Баку, Азербайджанская Республика

Author:

Sholan Rashad Farhad Ogly, PhD (Medicine), Head, Department of Kidney Diseases and Transplantology, Republican Medical Diagnostic Center, Baku, Republic of Azerbaijan

Поступила 08.04.2020
Принята к печати 06.05.2020

Received 08.04.2020
Accepted 06.05.2020

ВЗАИМОСВЯЗЬ ФЕНОТИПА И МЕТАБОЛИЗМА НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ

**Савченко А.А.¹, Борисов А.Г.¹, Кудрявцев И.В.^{2,3}, Гвоздев И.И.¹,
Мошев А.В.¹**

¹ Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, г. Красноярск, Россия

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

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

Резюме. Целью исследования было изучение особенностей взаимосвязи между экспрессией рецепторов активации и адгезии нейтрофилов крови и внутриклеточной активностью ферментов у больных раком почки (РП). Больные (n = 72) с РП (Т3N0M0, светлоклеточный тип) были обследованы до хирургического лечения на базе Красноярского краевого онкологического диспансера. Диагноз «РП» подтвержден гистологически. Фенотип нейтрофилов крови изучали методом проточной цитометрии. Уровни экспрессии поверхностных рецепторов нейтрофилов оценивали по средней интенсивности флуоресценции. Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови измеряли биOLUMИнесцентным методом. Установлено, что изменение фенотипа нейтрофилов крови у больных с РП проявляется на фоне торможения основных внутриклеточных метаболических процессов и во взаимосвязи с ними. Особенности фенотипического состава нейтрофилов у больных с РП было уменьшение относительного количества клеток, экспрессирующих адгезивные (CD11b и CD62L) и функциональные (CD64 и HLA-DR) рецепторы. Нейтрофилы крови больных раком интенсивнее экспрессировали такие молекулы, как CD11b, CD16 и HLA-DR. Эти изменения в фенотипе нейтрофилов крови у больных с РП определялись на фоне выраженного уменьшения количества незрелых клеток. Метаболические особенности цитоплазматического компартмента нейтрофилов крови у больных с РП характеризовались снижением активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ключевого и инициализирующего фермента пентозофосфатного цикла) и НАДН-зависимой реакцией лактатдегидрогеназы (НАДН-ЛДГ, анаэробный гликолиз). Митохондриальный метаболизм у нейтрофилов больных с РП характеризовался разнонаправленными изменениями активности НАД- (НАДН-ГДГ) и НАДФ-зависимых глутаматдегидрогеназ (снижение активности НАД-зависимых и повышение активности НАДФ-зависимых) и снижением активности НАДН-зависимая реакция малатдегидрогеназы. Установленные особенности в активности митохондриальных ферментов характеризуют нарушение НАД-зависимых процессов, что может привести к снижению интенсивности аэробных энергетических процессов. С помощью корреляционного анализа было обнаружено, что особенности взаимосвязей у больных РП определялись отрицательным влиянием активности НАДН-ГДГ и НАДН-ЛДГ на уровни экспрессии рецепторов активации и адгезии нейтрофилов. Только ак-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.А. Савченко, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев, И.И. Гвоздев, А.В. Мошев «Взаимосвязь фенотипа и метаболизма нейтрофилов крови у больных раком почки» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 887-896.

doi: 10.15789/1563-0625-IAM-2037

© Савченко А.А. и соавт., 2020

For citation:

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, I.V. Kudryavtsev, I.I. Gvozdev, A.V. Moshev "Immunophenotype and metabolism are linked in peripheral blood neutrophils from patients with kidney cancer", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 887-896.

doi: 10.15789/1563-0625-IAM-2037

DOI: 10.15789/1563-0625-IAM-2037

тивность глутатионредуктазы в нейтрофилах больных РП положительно коррелировала с экспрессией молекул CD23 и HLA-DR. Повышение активности энергетических процессов (в том числе процессов взаимодействия цикла трикарбоновых кислот с реакциями обмена аминокислот) в нейтрофилах крови больных раком почки может стимулировать уровни экспрессии рецепторов активации и адгезии и повышать противоопухолевую активность нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофилы, фенотип, антигены, метаболизм, активность ферментов, рак почки

IMMUNOPHENOTYPE AND METABOLISM ARE LINKED IN PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS FROM PATIENTS WITH KIDNEY CANCER

Savchenko A.A.^a, Borisov A.G.^a, Kudryavtsev I.V.^{b,c}, Gvozdev I.I.^a, Moshev A.V.^a

^a Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 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 the present study was to analyze the relationships between expression of activation and adhesion receptors on peripheral blood neutrophils, and intracellular activity of some neutrophil enzymes in patients with kidney cancer (KC). Patients and methods: the KC patients (n = 72) (T3N0M0, clear-cell type) were examined prior to surgical treatment at the Krasnoyarsk Regional Oncology Center. The diagnosis was verified histologically for all KC patients. The phenotype of blood neutrophils was studied using flow cytometry. The surface receptor expression levels of the neutrophils were evaluated by mean fluorescence intensity. NAD and NADP-dependent dehydrogenases activities in purified peripheral blood neutrophils were measured by bioluminescent method. Results: we have found that the phenotypic alterations in circulating KC patients' neutrophils appeared along with inhibition of main intracellular metabolic processes and were closely linked with them. The features of the phenotypic imbalance in the neutrophils from KC patients were associated with a decrease in blood cells expressing adhesive (CD11b and CD62L) and functional (CD64 and HLA-DR) receptors. Moreover, the patient's neutrophils expressed CD11b, CD16 and HLA-DR on their cell surface more intensively, than neutrophilic leukocytes from control group. These phenotypic changes in KC patients' blood neutrophils occurred in parallel with pronounced decrease in immature cells numbers. The metabolic changes of neutrophil cytoplasmic compartment in KC patients were determined by a decrease in Glu6PDH activity (a key and initializing enzyme of the pentose phosphate cycle) and NADH-LDH (anaerobic glycolysis). Mitochondrial metabolism in neutrophils of KC patients was characterized by multidirectional changes in the activity of NAD- and NADP-dependent glutamate dehydrogenases (decreased activity of NAD-dependent and increased activity of NADP-dependent) and a decrease in NADH-MDH activity. The established features in mitochondrial enzymes activities suggest some disturbances of NAD-dependent processes that could lead to down-regulation of aerobic energy processes. We guess that the decreased activity of plastic and energy processes in blood neutrophils of KC patients could affect the receptor expression levels. By means of correlation analysis, we have found that the relationships in KC patients were determined by negative effects of NADH-GDH and NADH-LDH activities upon expression of activation and adhesion receptors in blood neutrophils. Of these enzymes, only glutathione reductase activity in neutrophils from KC patients was positively linked with the CD23 and HLA-DR expression. Thus, an increase in activity of energy processes (e.g., coupling the tricarboxylic acid cycle to amino acid metabolism) in blood neutrophils from the patients with kidney cancer could stimulate expression levels of activation and adhesion receptors and potentially increase antitumor activity of neutrophils.

Keywords: neutrophils, phenotype, antigens, metabolism, enzyme activity, kidney cancer

The study was performed as part of the project “Mechanisms of metabolic reprogramming of the innate immune cells during tumor growth” was funded by Krasnoyarsk Regional Fund of Science

Introduction

Neutrophils are one of the most abundant type of innate immune cells that take part in various immunoinflammatory processes. It is well-known that neutrophils participates not only in responses of the immune system to infection but also play an important role in antitumor immunity. Several studies have shown that the neutrophils frequency increases during tumor progression and cancer-associated chronic inflammation and, overall, can rise up 90% within total leucocytes population on terminal stages [20, 28, 37]. An increased neutrophil-to-lymphocyte ratio was a prognostic indicator of unfavorable prognosis in patients with different cancers [21, 22]. However, there were several papers showing that in patients with cancer peripheral blood neutrophils frequency could be down-regulated if compared with healthy controls [6, 10]. Furthermore, neutrophils are often recruited to the tumor microenvironment where they

could constitute a significant part of tumor-infiltrating cells [9, 34, 36].

It has been established that the functional activity of neutrophils (such as phagocytes, ROS production ect.) from peripheral blood of cancer patients could be altered. For instance, most recent paper by Zeindler J. et al. (2019) have shown that neutrophilic granulocytes positive for myeloperoxidase carried out active phagocytosis of breast cancer cells [37]. Moreover, the favorable prognosis was strongly associated with high intracellular activity of this enzyme in phagocytic cells. Next, the mechanism of trogoptosis – antibody-dependent tumor cell killing by neutrophils – was defined [19]. During phagocytosis, neutrophils react to cancer cells releasing several types of oxidants to kill the cancer cells. Additionally, it has been shown that neutrophils basic level of primary reactive oxygen species production in patients with kidney cancer (KC) was increased [15, 26, 28]. While stimulated neutrophils from the same patients group exhibited the reduced ability of superoxide radical synthesis.

It can be assumed that neutrophils functional activity alterations during tumor progression could be associated with their phenotype changes. It was shown that peripheral blood neutrophils from patients with epithelial ovarian cancer showed reduced levels of

Англоязычный список ферментов

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Glu6PDH)

Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Gly3PDH)

Lactate dehydrogenase, NAD-dependent reaction (LDH)

NADP-dependent malate dehydrogenase decarboxylated (NADP-MDH)

NADP-dependent glutamate dehydrogenase (NADP-GluDH)

NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH)

Malate dehydrogenase, NAD-dependent reaction (MDH)

NAD-dependent glutamate dehydrogenase (NAD-GluDH)

NAD-dependent isocitrate dehydrogenase (NAD-ICDH)

NADH-dependent reaction of lactate dehydrogenase (NADH-LDH)

NADH-dependent reaction of malate dehydrogenase (NADH-MDH)

Glutathione reductase (GR)

NADH-dependent reaction of glutamate dehydrogenase (NADH-GluDH)

NADPH-dependent reaction of glutamate dehydrogenase (NADPH-GluDH)

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ)

Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (ГЗФДГ)

Лактатдегидрогеназа, НАД-зависимая реакция (ЛДГ)

НАДФ-зависимая декарбоксилирующая малатдегидрогеназа (НАДФМДГ)

НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа (НАДФГДГ)

НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДФИЦДГ)

Малатдегидрогеназа, НАД-зависимая реакция (МДГ)

НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа (НАДГДГ)

НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДИЦДГ)

НАДН-зависимая реакция лактатдегидрогеназы (НАДН-ЛДГ)

НАДН-зависимая реакция малатдегидрогеназы (НАДН-МДГ)

Глутатионредуктаза (ГР)

НАДН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы (НАДН-ГДГ)

НАДФН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы (НАДФН-ГДГ)

L-selectin expression while MAC-1 (macrophage-1 antigen, CR-3, CD11b/CD18) expression was increased [2]. Mac-1 has been proven to be a key adhesion molecule that promoted cancer progression and mediated tumor cells adhesion to blood vessel endothelial cell. Next, CD66b⁺-neutrophil frequency was reduced in the invasive front from patients with lip squamous cell carcinoma [4]. CD66b (CGM6, NCA-95) is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked protein that induces the activation of neutrophilic granulocytes and plays an important part in cell-to-cell adhesion.

Eventually, peripheral blood neutrophils have both pro-tumor and antitumor activities. The antitumor activity of neutrophils is realized due to their mechanisms of cytotoxicity and their ability to stimulate different innate and adaptive immunity cells [3, 4, 11]. The following pro-tumor functions of neutrophils were distinguished: stimulation of angiogenesis, tumor cell dissemination, as well as immune suppression [3, 11, 36]. A change in the orientation of neutrophil function in relation to tumor cells was defined as reprogramming. Moreover, various methods for changing the functional activity of neutrophils were currently being developed [11]. Metabolic reprogramming is one of the most actively developing method for regulating immune system cells functional activity *in vitro* [1, 33]. Changes in cell metabolism through a system of transcription factors affect the differentiation and functional activation of cells. It is known that the activity of metabolic processes in circulating neutrophils were altered in patients with cancer [23, 29]. It can be suggested that neutrophils intracellular metabolism imbalance in cancer patients can also be linked with neutrophils phenotype variations.

The aim of the study was to analyze the correspondence between peripheral blood neutrophil activation and adhesion receptors expression and activity of neutrophils intracellular enzymes in patients with KC.

We have studied the activity of NAD(P)-dependent dehydrogenases as indicators characterizing the state of the intracellular metabolic processes in the neutrophils. This type of the enzymes plays an important part in intracellular metabolism. Firstly, the main electron carriers in cells are pyridine nucleotides and hence the dehydrogenases are actively involved in bioenergy processes. Secondly, the NAD(P)-dependent dehydrogenases determine adaptive changes in intracellular metabolism by participating in the directed coordination of conjugated metabolic fluxes [14, 24, 25].

Materials and methods

Study participants

Patients (n = 72, age – 45–62 years old) with KC (T3N0M0, clear cell type) were examined prior to surgical treatment in Krasnoyarsk Regional Oncology

Center. The diagnosis of KC of all patients was verified histologically. Peripheral blood samples from 51 healthy volunteers with the same age range were used as a control group. All studies were performed with the informed consent of the patients and in accordance with the Helsinki Declaration of the World Association “Ethical principles of scientific medical research involving human” as amended in 2013 and “Rules of clinical practice in the Russian Federation” approved by the Order of the Ministry of Health of Russia of 19.06.2003 (No. 266).

Flow cytometry

The phenotype of blood neutrophils were studied by direct immunofluorescence using monoclonal antibodies (all from Beckman Coulter, USA) labeled with FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7), AF700 (alexa fluor 700) and AF750 (alexa fluor 750): CD11b, CD62L, CD16, CD23, CD28, CD64 и HLA-DR. The distribution of antibodies in fluorescence channels was carried out in accordance with the principles of panel formation for the multicolor cytofluorimetric investigations [13]. The surface receptor expression levels were evaluated by mean fluorescence intensity (MFI). Sample preparation was performed according to the standard procedure [17]. Erythrocyte lysis was carried out by a no-wash technology using the reagent VersaLyse (Beckman Coulter, USA). The analysis of stained cells was performed on a flow cytometer Navios (Beckman Coulter, USA) of the Center of collective usage Krasnoyarsk Regional Center of Research Equipment of Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”. Not less than 50 000 neutrophils were analyzed per each sample.

Bioluminescent analysis

Neutrophils were isolated from whole heparinized blood by a standard method in the density gradient of ficoll-urografin. The cells were destroyed by osmotic lysis with addition of 2 mM dithiotreitol. Activities of the following enzymes were measured by the bioluminescent method: glucose-6-phosphate dehydrogenase (Glu6PDH), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Gly3PDH), NAD- and NADH-dependent reactions of lactate dehydrogenase (LDH and NADH-LDH, respectively), NADP-dependent malate dehydrogenase decarboxylated (NADP-MDH), NADP and NADPH-dependent reactions of glutamate dehydrogenase (NADP-GluDH and NADPH-GluDH, respectively), NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH), NAD- and NADH-dependent reactions of malate dehydrogenase (MDH and NADH-MDH, respectively), NAD- and NADH-dependent reactions of glutamate dehydrogenase (NAD-GluDH and NADH-GluDH, respectively), NAD-dependent isocitrate dehydrogenase (NAD-ICDH) and glutathione reductase (GR). The bioluminescent study was carried out on NAD(P):FMN oxidoreductase-luciferase from

Photobacterium leiognathi (Institute of Biophysics, Siberian Division of Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk) [25]. Activities of NAD(P)-dependent dehydrogenases in the neutrophils was determined on the 36-channel biochemiluminescence analyzer BLM-3607 (MedBioTech Ltd, Russia) and were expressed in enzymatic units (1 U = 1 μ mol/min).

Statistical analysis

Statistical description was performed by counting the median (Me) and the inter-quarter span in the form of 25 and 75 percentiles ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$). Significance of differences between indicators was assessed by nonparametric criterion Mann-Whitney U test. The Spearman rank correlation coefficients were calculated to characterize the strength of the relationship between the expression of receptors on the neutrophil membrane and the activity of their enzymes. Statistical analysis was performed in an application package Statistica 6.1 (StatSoft Inc.).

Results

First, we found that the relative number of stab (band cells or immature neutrophils) neutrophils was reduced in the peripheral blood from KC patients (Table 1). The phenotypic composition of neutrophils in patients with KC was characterized by decreased levels of CD11b⁺, CD62L⁺, CD64⁺, HLA-DR⁺ and CD64⁺HLA-DR⁺ cells, but we found the increased relative number of CD28⁺ neutrophils. Next, our findings demonstrated that peripheral blood neutrophils from cancer patients showed significant increase in CD11b, CD16, CD28 and HLA-DR MFI levels if compared with healthy control values (Table 2).

Additionally, using bioluminescent method it was found that the activities of such enzymes as Glu6PDH, NADP-MDH, NAD-GluDH, NADH-LDH, NADH-MDH and NADH-GluDH were reduced in KC patients blood neutrophils (Table 3). At the same time, the activities of Gly3PDH, NADP-GluDH and NADPH-GluDH in circulating neutrophils from KC patients were significantly higher than in samples from control group. The relationships between enzymes activities and cell-surface phenotypes were studied using correlation analysis. In the control group positive correlation was detected between NADH-GluDH activity and relative number of mature segmented neutrophils ($r = 0.68$, $p = 0.003$). In addition, the negative correlation between Glu6PDH activity and CD62L⁺ neutrophil percentage ($r = -0.78$, $p = 0.039$) was revealed in the control group. In blood samples from control group we also found the following significant association: NADP-MDH *versus* HLA-DR MFI levels ($r = 0.79$, $p = 0.033$) and NADH-GluDH *versus* CD11b MFI levels ($r = 0.90$, $p = 0.009$).

Finally, in KC patients we revealed statistically significant negative correlation between NADH-GluDH activities and relative numbers of segmented

neutrophils ($r = -0.37$, $p = 0.017$). Within KC group correlations between NADH-LDH activity and CD62L⁺ as well as HLA-DR⁺ neutrophil frequencies were also identified ($r = -0.46$, $p = 0.008$ and $r = -0.36$, $p = 0.041$, respectively) were found. Moreover, HLA-DR expression on peripheral blood neutrophils from those patients was negatively correlated with NADP-MDH and NADP-ICDH activities ($r = -0.38$, $p = 0.029$ and $r = -0.39$, $p = 0.029$, respectively). Next, NAD-GluDH was the only one enzyme in KC patients' neutrophils whose activity was negatively interconnected with CD16 ($r = -0.49$, $p = 0.007$), CD23 ($r = -0.67$, $p = 0.017$) and HLA-DR ($r = -0.52$, $p = 0.002$) MFI values. While GR enzymatic activity showed positive relationships with CD23 and HLA-DR MFI levels ($r = 0.66$, $p = 0.020$ and $r = 0.37$, $p = 0.037$, respectively).

Discussion

Currently, we investigated frequency, maturation stages and phenotype alterations in peripheral blood neutrophils from kidney cancer patients. Here, we describe for the first time that the number of stab neutrophils in the peripheral blood of KC patients was significantly reduced if compared with healthy control. Moreover, the results of the Sumida K. et al. (2012) study showed that the number of tumor-infiltrating neutrophils increased primarily due to the CD11-positive stab cells [30]. Our study showed the reduced frequency of CD11b- and CD62L-positive neutrophils in blood samples from of KC patients. It is known that CD11b is a membrane glycoprotein, the member of integrin superfamily, that forms α -chain of CR3 receptor, and it functionally mediates cell adhesion, transmigration and chemotaxis [12]. While CD62L belongs to the family of L-selectins and together with P-selectin provides the initial contact of circulating leukocytes with endothelial cells, and these interaction is the first stage of cell extravasation [16]. We assume that the decrease in the number of blood neutrophils expressing adhesion receptors in KC patients could be closely linked with cell migration at tumor site. Functionally active neutrophils in tumor environment could be reprogrammed into so-called "polymorphonuclear neutrophil myeloid-derived suppressor cells" (or PMN-MDSCs) – f specific subset of myeloid cells able to inhibit antitumor immune response [9, 33]. It is also known that PMN-MDSCs could be detected within peripheral blood circulating immature neutrophils, and PMN-MDSCs frequency mostly decreased in cancer patients [33].

The phenotypic state of the blood neutrophils in cancer patients was also characterized by reduced number of cells expressing on their cell membranes such activation receptors as CD64 and HLA-DR. CD64 (Fc γ RI) is a high affinity IgG receptor which is the only receptor type capable of binding free antibodies [8]. Activated neutrophils during the expression of this receptor can retain a large number

TABLE 1. MORPHOLOGY AND PHENOTYPE OF BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH KC, Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)

Parameters	Control (n = 51)	Patients with KC (n = 72)	p
Neutrophils, 10 ⁹ /l	3.25 (2.48-4.23)	3.18 (2.35-4.56)	
Stab neutrophils, %	2.1 (0.0-4.0)	0.0 (0.0-1.0)	< 0.001
Segmented neutrophils, %	55.1 (47.0-62.0)	58.0 (49.0-65.1)	
CD11b ⁺ , %	99.9 (99.8-100.0)	99.8 (99.7-99.9)	0.032
CD16 ⁺ , %	92.4 (88.4-96.7)	90.1 (85.8-95.4)	
CD23 ⁺ , %	10.5 (6.6-15.5)	8.5 (4.7-17.1)	
CD62L ⁺ , %	99.6 (98.8-99.8)	97.4 (90.4-99.3)	< 0.001
CD64 ⁺ , %	15.7 (5.5-92.1)	7.4 (4.1-15.5)	0.045
HLA-DR ⁺ , %	98.2 (94.2-99.2)	89.8 (59.7-97.7)	< 0.001
CD64 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	8.4 (5.2-13.0)	5.7 (2.8-9.6)	0.048

TABLE 2. EXPRESSION LEVELS OF THE ANTIGENS ON BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH KC, Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)

Parameters	Control (n = 51)	Patients with KC (n = 72)	p
CD11b ⁺	110.40 (19.33-214.09)	128.92 (71.96-211.46)	0.048
CD16 ⁺	108.51 (79.80-177.05)	157.04 (93.21-230.07)	0.046
CD23 ⁺	6.39 (5.00-7.78)	6.23 (4.86-7.30)	
CD62L ⁺	5.61 (2.79-7.54)	5.57 (3.54-7.96)	
CD64 ⁺	2.23 (1.61-3.45)	2.17 (1.71-7.68)	
HLA-DR ⁺	1.66 (1.47-1.85)	1.85 (1.63-2.76)	0.005

TABLE 3. ACTIVITY OF NAD- AND NADP-DEPENDENT DEHYDROGENASES IN BLOOD NEUTROPHILS OF THE PATIENTS WITH KC, Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)

Parameters	Control n = 51	Patients with KC n = 72	p
Glu6PDH	1.94 (0.63-9.93)	0.35 (0.02-1.28)	< 0.001
Gly3PDH	0.12 (0.01-0.36)	1.02 (0.11-3.25)	< 0.001
LDH	7.11 (1.62-28.91)	7.45 (1.55-26.34)	
NADP-MDH	1.54 (0.52-2.20)	0.21 (0.01-1.35)	0.014
NADP-GluDH	1.58 (0.15-6.08)	5.44 (2.95-15.99)	0.048
NADP-ICDH	3.66 (1.33-10.30)	2.31 (1.41-10.89)	
MDH	12.96 (2.10-54.00)	9.33 (1.08-53.38)	
NAD-GluDH	1.26 (0.31-5.23)	0.45 (0.01-2.68)	0.038
NAD-ICDH	0.18 (0.01-1.24)	0.14 (0.01-1.71)	
NADH-LDH	61.25 (10.01-80.07)	15.98 (2.31-30.46)	0.009
NADH-MDH	50.13 (10.82-106.11)	25.67 (3.08-44.03)	0.024
GR	1.06 (0.11-8.22)	5.44 (1.05-19.36)	
NADH-GluDH	15.85 (1.61-46.04)	6.86 (0.80-19.39)	0.037
NADPH-GluDH	0.12 (0.01-2.70)	21.90 (4.68-74.08)	< 0.001

of IgG molecules on their surface and realize the function of the trogoptosis [19]. HLA-DR is major histocompatibility complex class II molecule that is responsible for antigen presentation to Th cells [18]. Reduced levels of the blood neutrophils expressing activation markers could also be linked with cell migration alterations occurred in KC patients. It should be also noted that circulating neutrophils from KC patients were characterized by up regulated low affinity IgG-receptor (CD16), CD11b and HLA-DR expression.

Intracellular metabolism largely determines functional activity of neutrophils in various immunopathological conditions [24, 27]. Tumor-infiltrating cell reprogramming could be realized through alterations in cell metabolic processes [35]. Our study found that the imbalance in peripheral blood neutrophils phenotype found in KC patients was accompanied by altered activity of intracellular metabolic processes. For example, Glu6PDH is the key and initializing enzyme of the pentose phosphate cycle [14, 32]. The activity of this enzyme in blood neutrophils in KC patients was reduced, that fact pointed to down-regulation of several reactions in macromolecular synthesis. The most likely cause could be the insufficient intensity of the initial glycolysis reactions. While the increase in Gly3PDH activity in patients was apparently a compensatory reaction of intracellular metabolism. This enzyme transfers lipid catabolism products to redox reactions of the glycolysis [14, 26]. However, the low activity of the anaerobic LDH reaction in neutrophils from KC patients could indicate the insufficiency of anaerobic glycolysis. It should be noted that a low activity of the glycolysis (the main energy process for granulocytes) was associated with a lack of functional reactions of neutrophils [14, 26, 31].

Malic-enzyme is involved in xenobiotic catabolism reactions, and it also is a key enzyme in lipid anabolism reactions [26]. A decrease in the enzyme activity in patients' neutrophils could affect the sensitivity of cells to regulatory and functional signals as well as their resistance to toxic effects.

Mitochondrial respiration is not the main energy process of neutrophils, but mitochondrial metabolism integrates all the basic metabolic reactions together and, thus, being the key mechanisms of functional regulation [1, 5]. The activity of the two studied enzymes of the tricarboxylic acid cycle – NAD-ICDH and MDH – in blood neutrophils of KC patients corresponded to the control values. Accordingly, we could assume that the similar state of substrate flow rate along the tricarboxylic acid cycle was provided by mechanisms of additional substrate administration (with insufficient glycolysis activity). Next, in neutrophils from KC patients we found multidirectional changes in functional activity of NAD and NADP-dependent glutamate dehydrogenases – the activity of NAD-dependent glutamate dehydrogenase (both reactions) was decreased while the activity of NADP-

dependent glutamate dehydrogenase (both reactions) was increased. The similar changes in the activity of glutamate dehydrogenases determined a decrease in NAD-dependent and an increase in NADP-dependent substrate metabolism between the tricarboxylic acid cycle and amino acid metabolism reactions in neutrophils of KC patients. We assume that the increase in NADP-dependent substrate metabolism could support the intensity of substrate flow along the tricarboxylic acid cycle. However, the decrease in NAD-dependent substrate metabolism could reduce the intensity of aerobic respiration of mitochondria in the neutrophils of KC patients as evidenced by a decrease in the activity of NADH-MDH. This enzyme is the key in the reactions of the malate-aspartate shunt that determines the effectiveness of the respiratory chain of mitochondria [14, 26].

Correlation analysis between the neutrophil phenotype (including receptor expression) and enzyme activities revealed metabolic reactions that were associated with activation and adhesion receptors expression. The inversion of the correlation in KC patients between mature neutrophils content and NADH-GluDH activity was found: in control group the correlation was positive, while in KC patients – negative. This inversion characterized a decrease in tricarboxylic acid cycle substrates outflow with an increase in the number of mature neutrophils in patients. Therefore, it could be a compensatory reaction aimed to the maintenance of aerobic respiration in neutrophils. The interconnections of the intracellular enzymes activity with the neutrophil phenotype were mainly determined by the role of metabolic processes in different aspects of cells functional activation. In particular, the number of CD62L⁺ neutrophils in control group was negatively correlated with Glu6PDH activity while in KC patients – with NADH-LDH. Accordingly, the migration activity of blood neutrophils in control group was largely determined by the activity of plastic metabolism and in KC patients – by the intensity of substrate flow in anaerobic glycolysis. In addition, HLA-DR⁺ neutrophils frequency in KC patients was negatively associated with NADH-LDH activity that characterized the disruption of anaerobic energy during functional activation of cells.

Correlations between enzyme activity and cell-surface receptor expression levels were more pronounced in both groups. Moreover, this complex of relationships in the control group was represented only by positive relationships while the KC patients revealed mostly negative correlations. The inversion of the relationship between the expression of the HLA-DR and NADP-MDH activity has been established: the positive relationship in control group and negative correlation in cancer patients. Accordingly, HLA-DR expression was accompanied by lipid anabolism activation in neutrophils from control group while it manifested itself when inhibiting these reactions in cancer. In addition, the expression of this antigen was

accompanied by a decrease in anaerobic glycolysis intensity (low NADH-LDH activity) as well as in mitochondrial compartment metabolism (low activity of NADP-ICDH and NAD-GluDH) of KC patients neutrophils. In general, expression of activation (CD16 and CD23) and adhesion (CD62L) antigens by KC patients neutrophils was mainly accompanied by the inhibition of NAD-dependent influx of substrates onto the tricarboxylic acid cycle *via* NADGDG. Glutathione reductase was the only enzyme whose activity was positively correlated with the expression of CD23 and HLA-DR by KC patients neutrophils. This enzyme is part of the glutathione-dependent antioxidant system, and its activity increases with the intensification of cell peroxide processes [7, 26]. Therefore, the level of CD23 and HLA-DR expression on the neutrophil membrane of KC patients changed according to the intensity of intracellular antioxidant processes.

Conclusion

Alterations in blood neutrophils phenotype received from patients with kidney cancer were manifested against the background of inhibition of the main intracellular metabolic processes. The features of the phenotypic imbalance of KC patients' neutrophils were the associated with the diminution in peripheral blood of cells expressing adhesive (CD11b and CD62L) and functional (CD64 and HLA-DR) receptors. Moreover, circulating patient' neutrophils expressed such molecules as CD11b, CD16 and HLA-DR more intensively. These phenotype changes in KC patients blood neutrophils were carried out against a background of a pronounced decrease in

immature cells number. Moreover, myeloid-derived suppressor cells with the function of inhibiting antitumor immunity could be defined as immature polymorphonuclear neutrophils. The metabolic features of the cytoplasmic compartment of KC patients blood neutrophils were determined by a decrease in Glu6PDH activity (a key and initializing enzyme of the pentose phosphate cycle) and NADH-LDH (anaerobic glycolysis). Mitochondrial metabolism in neutrophils of KC patients was characterized by multidirectional changes in the activity of NAD- and NADP-dependent glutamate dehydrogenases (decreased activity of NAD-dependent and increased activity of NADP-dependent) and a decrease in NADH-MDH activity. The established features in mitochondrial enzymes activities characterized the violation of NAD-dependent processes which could led to down-regulation of aerobic energy processes. We believe that a decrease in the activity of plastic and energy processes of KC patients blood neutrophils could affect receptor expression levels. Using correlation analysis that features of the relationships in KC patients were determined, we found the negative effect of NADH-GDH and NADH-LDH activity on activation and adhesion neutrophil' receptors expression. Only glutathione reductase activity in KC patients' neutrophils was positively linked with the CD23 and HLA-DR expression. Thus, an increase in the activity of energy processes (including the processes of interaction of the tricarboxylic acid cycle with amino acid exchange reactions) in the blood neutrophils from patients with kidney cancer could stimulate expression levels of activation and adhesion receptors and, thereby, increase the antitumor activity of neutrophils.

References

1. Bao Y., Ledderose C., Seier T., Graf A.F., Brix B., Chong E., Junger W.G. Mitochondria regulate neutrophil activation by generating ATP for autocrine purinergic signaling. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, no. 39, pp. 26794-26803.
2. Bednarska K., Klink M., Wilczyński J.R., Szyłło K., Malinowski A., Sułowska Z., Nowak M. Heterogeneity of the Mac-1 expression on peripheral blood neutrophils in patients with different types of epithelial ovarian cancer. *Immunobiology*, 2016, Vol. 221, no. 2, pp. 323-332.
3. Brandau S., Dumitru C.A., Lang S. Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Semin. Immunopathol.*, 2013, Vol. 35, no. 2, pp. 163-176.
4. da Silva K.D., Caldeira P.C., Alves A.M., Vasconcelos A.C.U., Gomes A.P.N., de Aguiar M.C.F., Tarquinio S.B.C. High CD3(+) lymphocytes, low CD66b(+) neutrophils, and scarce tumor budding in the invasive front of lip squamous cell carcinomas. *Arch. Oral. Biol.*, 2019, Vol. 104, pp. 46-51.
5. Dahlgren C., Gabl M., Holdfeldt A., Winther M., Forsman H. Basic characteristics of the neutrophil receptors that recognize formylated peptides, a danger-associated molecular pattern generated by bacteria and mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, 2016, Vol. 114, pp. 22-39.
6. Delebarre M., Dessein R., Lagrée M., Mazingue F., Sudour-Bonnange H., Martinot A., Dubos F. Differential risk of severe infection in febrile neutropenia among children with blood cancer or solid tumor. *J. Infect.*, 2019, Vol. 79, no. 2, pp. 95-100.
7. Fan H.J., Tan Z.B., Wu Y.T., Feng X.R., Bi Y.M., Xie L.P., Zhang W.T., Ming Z., Liu B., Zhou Y.C. The role of ginsenoside Rb1, a potential natural glutathione reductase agonist, in preventing oxidative stress-induced apoptosis of H9C2 cells. *J. Ginseng. Res.*, 2020, Vol. 44, no. 2, pp. 258-266.
8. Gatti A., Ceriani C., De Paschale M., Magnani C., Villa M., Viganò P., Clerici P., Brando B. Quantification of neutrophil and monocyte CD64 expression: a predictive biomarker for active tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2020, Vol. 24, no. 2, pp. 196-201.

9. Giese M.A., Hind L.E., Huttenlocher A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood*, 2019, Vol. 133, no. 20, pp. 2159-2167.
10. Goto K., Matsuyama R., Suwa Y., Arisaka S., Kadokura T., Sato M., Mori R., Kumamoto T., Taguri M., Endo I. The maximum chemiluminescence intensity predicts severe neutropenia in gemcitabine-treated patients with pancreatic or biliary tract cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2018, Vol. 82, no. 6, pp. 953-960.
11. Granot Z. Neutrophils as a therapeutic target in cancer. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1710. doi: 10.3389/fimmu.2019.01710.
12. Kelm M., Lehoux S., Azcutia V., Cummings R.D., Nusrat A., Parkos C.A., Brazil J.C. Regulation of neutrophil function by selective targeting of glycan epitopes expressed on the integrin CD11b/CD18. *FASEB J.*, 2020, Vol. 34, no. 2, pp. 2326-2343.
13. Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
14. Kumar S., Dikshit M. Metabolic insight of neutrophils in health and disease. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2099. doi: 10.3389/fimmu.2019.02099.
15. Kurtasova L.M., Savchenko A.A., Shkapova E.A. Clinical aspects of functional disorders of neutrophilic granulocytes in oncopathology. *Novosibirsk: Nauka*, 2009. 183 p.
16. Lokwani R., Wark P.A., Baines K.J., Fricker M., Barker D., Simpson J.L. Blood Neutrophils In COPD But Not Asthma Exhibit A Primed Phenotype With Downregulated CD62L Expression. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2019, Vol. 14, pp. 2517-2525.
17. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.
18. Mahmoodpoor A., Paknezhad S., Shadvar K., Hamishehkar H., Movassaghpour A.A., Sanaie S., Ghamari A.A., Soleimanpour H. Flow cytometry of CD64, HLA-DR, CD25, and TLRs for diagnosis and prognosis of sepsis in critically ill patients admitted to the intensive care unit: a review article. *Anesth. Pain. Med.*, 2018, Vol. 8, no. 6, e83128. doi: 10.5812/aapm.83128.
19. Matlung H.L., Babes L., Zhao X.W., van Houdt M., Treffers L.W., van Rees D.J., Franke K., Schornagel K., Verkuijlen P., Janssen H., Halonen P., Lieftink C., Beijersbergen R.L., Leusen J.H.W., Boelens J.J., Kuhnle I., van der Werff Ten Bosch J., Seeger K., Rutella S., Pagliara D., Matozaki T., Suzuki E., Menke-van der Houven van Oordt C.W., van Bruggen R., Roos D., van Lier R.A.W., Kuijpers T.W., Kubers P., van den Berg T.K. Neutrophils Kill antibody-opsonized cancer cells by trogoptosis. *Cell Rep.*, 2018, Vol. 23, no. 13, pp. 3946-3959.
20. Mishalian I., Granot Z., Fridlender Z.G. The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology*, 2017, Vol. 222, Iss. 1, pp. 82-88.
21. Pan Z., Zhang L., Liu C., Huang X., Shen S., Lin X., Shi C. Cisplatin or carboplatin? Neutrophil to lymphocyte ratio may serve as a useful factor in small cell lung cancer therapy selection. *Oncol. Lett.*, 2019, Vol. 18, no. 2, pp. 1513-1520.
22. Pirozzolo G., Gisbertz S.S., Castoro C., van Berge Henegouwen M.I., Scarpa M. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as prognostic marker in esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J. Thorac. Dis.*, 2019, Vol. 11, no. 7, pp. 3136-3145.
23. Rice C.M., Davies L.C., Subleski J.J., Maio N., Gonzalez-Cotto M., Andrews C., Patel N.L., Palmieri E.M., Weiss J.M., Lee J.M., Annunziata C.M., Rouault T.A., Durum S.K., McVicar D.W. Tumour-elicited neutrophils engage mitochondrial metabolism to circumvent nutrient limitations and maintain immune suppression. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, no. 1, 5099. doi: 10.1038/s41467-018-07505-2.
24. Richer B.C., Salei N., Laskay T., Seeger K. Changes in neutrophil metabolism upon activation and aging. *Inflammation*, 2018, Vol. 41, no. 2, pp. 710-721.
25. Savchenko A.A. Evaluation of NAD(P)-dependent dehydrogenase activities in neutrophilic granulocytes by the bioluminescent method. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine (Russia)*, 2015, Vol. 159, no. 5, pp. 692-695.
26. Savchenko A.A., Zdzitovetskii D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Chemiluminescent and enzyme activity of neutrophils in patients with widespread purulent peritonitis depending on the outcome of disease. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2014, Vol. 69, no. 5-6, pp. 23-28.
27. Savchenko A.A., Borisov A.G., Cherdancev D.V., Pervova O.V., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V. Features of the phenotype and NAD(P)-dependent dehydrogenases activity in neutrophil by patients with widespread purulent peritonitis in prognosis for sepsis development. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 3, pp. 369-376.
28. Shkapova E.A., Kurtasova L.M., Savchenko A.A. Lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence of blood neutrophils in patients with renal cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2010, Vol. 149, no. 2, pp. 239-241.
29. Sica A., Guarneri V., Gennari A. Myelopoiesis, metabolism and therapy: a crucial crossroads in cancer progression. *Cell Stress*, Vol. 3, no. 9, pp. 284-294.
30. Sumida K., Wakita D., Narita Y., Masuko K., Terada S., Watanabe K., Satoh T., Kitamura H., Nishimura T. Anti-IL-6 receptor mAb eliminates myeloid-derived suppressor cells and inhibits tumor growth by enhancing T-cell responses. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 8, pp. 2060-2072.
31. Tan C., Gu J., Chen H., Li T., Deng H., Liu K., Liu M., Tan S., Xiao Z., Zhang H., Xiao X. Inhibition of aerobic glycolysis promotes neutrophil to influx to the infectious site via CXCR2 in sepsis. *Shock*, 2020, Vol. 53, no. 1, pp. 114-123.

32. Thwe P.M., Ortiz D.A., Wankewicz A.L., Hornak J.P., Williams-Bouyer N., Ren P. Closing the Brief case: recurrent chromobacterium violaceum bloodstream infection in a glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient patient with a severe neutrophil defect. *J. Clin. Microbiol.*, 2020, Vol. 58, no. 2, pii: e00314-19. doi: 10.1128/JCM.00314-19.

33. Veglia F., Perego M., Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.*, 2018, Vol. 19, no. 2, pp. 108-119.

34. Veglia F., Tyurin V.A., Blasi M., De Leo A., Kossenkov A.V., Donthireddy L., To T.K.J., Schug Z., Basu S., Wang F., Ricciotti E., DiRusso C., Murphy M.E., Vonderheide R.H., Lieberman P.M., Mulligan C., Nam B., Hockstein N., Masters G., Guarino M., Lin C., Nefedova Y., Black P., Kagan V.E., Gabrilovich D.I. Fatty acid transport protein 2 reprograms neutrophils in cancer. *Nature*, 2019, Vol. 569, no. 7754, pp. 73-78.

35. Won W.J., Deshane J.S., Leavenworth J.W., Oliva C.R., Griguer C.E. Metabolic and functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells and their therapeutic control in glioblastoma. *Cell Stress*, 2019, Vol. 3, no. 2, pp. 47-65.

36. Wu L., Saxena S., Awaji M., Singh R.K. Tumor-associated neutrophils in cancer: Going Pro. *Cancers (Basel)*, 2019, Vol. 11, no. 4, E564. doi: 10.3390/cancers11040564.

37. Zeindler J., Angehrn F., Drosner R., Däster S., Piscuoglio S., Ng C.K.Y., Kilic E., Mechera R., Meili S., Isaak A., Weber W.P., Muenst S., Soysal S.D. Infiltration by myeloperoxidase-positive neutrophils is an independent prognostic factor in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2019, Vol. 177, no. 3, pp. 581-589.

Авторы:

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Гвоздев И.И. — младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Мошев А.В. — младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Authors:

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science 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

Gvozdev I.I., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Moshev A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

ОСОБЕННОСТИ ХАРАКТЕРА КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ – АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ИММУННОЙ РЕГУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ АТРОФИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ И РАКОМ ЖЕЛУДКА

**Смирнова О.В., Цуканов В.В., Синяков А.А., Москаленко О.Л.,
Елманова Н.Г., Овчаренко Е.С.**

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Резюме. Хронический атрофический гастрит и рак желудка – звенья одного патогенетического процесса. Вероятность развития рака желудка прямо пропорциональна степени атрофических изменений, выявляемых одновременно в антральном отделе и в теле желудка. Роль иммунной системы в трансформации предраковых заболеваний в рак неоспорима. При развитии злокачественного заболевания изменения в системах перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты становятся значимыми и способствуют прогрессированию опухоли и развитию метастазов. Одномоментное изучение процессов липопероксидации и показателей антиоксидантной защиты с активностью фагоцитов позволит оценить вклад каждого из процессов в развитии хронического атрофического гастрита и рака желудка.

Цель исследования – изучение корреляционной зависимости между показателями перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты и хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов при хроническом атрофическом гастрите и раке желудка. Обследовано 40 больных с хроническим гастритом, 22 пациента с хроническим атрофическим гастритом и 40 больных с раком желудка. Контрольную группу составили 50 практически здоровых добровольцев аналогичного возраста. Оценка спонтанной и индуцированной продукции активных форм кислорода нейтрофилами и моноцитами осуществлялась хемилюминесцентным анализом. Параметры перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты определяли спектрофотометрическими методами. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica v. 8.0 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения показателей определялась с помощью метода Колмогорова–Смирнова (с поправкой Лилieforsa). Количественные показатели, учитывая нор-

Адрес для переписки:

*Смирнова Ольга Валентиновна
Научно-исследовательский институт медицинских
проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (923) 228-06-62.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru*

Address for correspondence:

*Smirnova Olga V.
Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zheleznyak str., 3g.
Phone: 7 (923) 228-06-62.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru*

Образец цитирования:

*О.В. Смирнова, В.В. Цуканов, А.А. Синяков,
О.Л. Москаленко, Н.Г. Елманова, Е.С. Овчаренко
«Особенности характера корреляционных взаимосвязей
показателей перекисного окисления липидов –
антиоксидантной защиты и иммунной регуляции
у больных хроническим атрофическим гастритом
и раком желудка» // Медицинская иммунология, 2020.
Т. 22, № 5. С. 897-906.
doi: 10.15789/1563-0625-TRB-2032*

© Смирнова О.В. и соавт., 2020

For citation:

*O.V. Smirnova, V.V. Tsukanov, A.A. Sinyakov,
O.L. Moskalenko, N.G. Elmanova, E.S. Ovcharenko “Typical
relationships between the indexes of lipid peroxidation/
antioxidant protection and immune regulation in the patients
with chronic atrophic gastritis and stomach cancer”, Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020,
Vol. 22, no. 5, pp. 897-906.
doi: 10.15789/1563-0625-TRB-2032*

DOI: 10.15789/1563-0625-TRB-2032

мальное распределение, описывались с использованием медианы (Me) и интерквартильного разброса ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$). Для изучения статистической значимости различий между количественными признаками представленных групп применяли критерий Манна–Уитни. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Пирсону (r). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Корреляционный анализ показал, что у больных с хроническим атрофическим гастритом нарастает, а у больных с раком желудка снижается количество положительных связей, сила корреляционной зависимости и появляются новые взаимосвязи между показателями хемилюминесцентной активности нейтрофилов и моноцитов в спонтанном и индуцированном состоянии и параметрами малонового диальдегида, активностью ферментов супероксиддисмутазы и каталазы. При хроническом атрофическом гастрите и раке желудка установлены особенности корреляционной картины взаимосвязей между показателями перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты и активностью нейтрофилов и моноцитов.

Ключевые слова: хронический атрофический гастрит, рак желудка, корреляция, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, хемилюминесценция, нейтрофилы, моноциты

TYPICAL RELATIONSHIPS BETWEEN THE INDEXES OF LIPID PEROXIDATION/ANTIOXIDANT PROTECTION AND IMMUNE REGULATION IN THE PATIENTS WITH CHRONIC ATROPHIC GASTRITIS AND STOMACH CANCER

Smirnova O.V., Tsukanov V.V., Sinyakov A.A., Moskalenko O.L., Elmanova N.G., Ovcharenko E.S.

Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Chronic atrophic gastritis and gastric cancer represent distinct steps of one pathogenic process. The risk of developing cancer of the stomach is directly proportional to the degree of atrophic changes simultaneously detected in antral segment and in the body of the stomach. The role of immune system in transformation of precancerous diseases into cancer is beyond doubt. During development of the malignant disease, the changes in lipid peroxidation systems – antioxidant defense become significant and contribute to the progression of the tumor and the development of metastases. A simultaneous study of lipid peroxidation and antioxidant defense indices along with phagocytic activity will allow us to evaluate relative contribution of these processes to development of chronic atrophic gastritis and gastric cancer. Purpose of the present study was to assess correlations between the lipid peroxidation indices, i.e. antioxidant protection, and chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes and monocytes in chronic atrophic gastritis and gastric cancer. Forty patients with chronic gastritis, 22 patients with chronic atrophic gastritis and 40 patients with gastric cancer were examined. The control group consisted of 50 practically healthy age-matched volunteers. Evaluation of spontaneous and induced production of reactive oxygen species by neutrophils and monocytes was carried out by chemiluminescent analysis. The parameters of lipid peroxidation/ antioxidant protection were determined by spectrophotometric methods. Statistical data processing was carried out using the Statistica v. 8.0 program (StatSoft Inc., USA). The normal distribution of indices was tested using the Kolmogorov–Smirnov method (adjusted by Lillefors). Quantitative indicators, given the normal distribution, were described using the median (Me) and interquartile scatter ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$). To study statistical significance of differences between quantitative characteristics, the Mann–Whitney test was used. To study strength of relationships of these indicators, the Pearson rank correlation coefficient (r) was calculated. The critical significance level (p) when testing statistical hypotheses was taken equal to 0.05. Correlation analysis showed that the weight of positive correlations increases in patients with chronic atrophic gastritis, and it decreases in patients with gastric cancer, the strength of the correlation dependence and new relationships appear between chemiluminescent activity of neutrophils and

monocytes in a spontaneous and induced state, and the amounts of malonic dialdehyde, enzyme activities of superoxide dismutase and catalase. In chronic atrophic gastritis and gastric cancer we have established the features of correlation patterns between lipid peroxidation/antioxidant protection indices, and activity of neutrophils and monocytes.

Keywords: chronic atrophic gastritis, gastric cancer, correlation, lipid peroxidation, antioxidant defense, chemiluminescence, neutrophils, monocytes

Введение

В настоящее время в развитых странах мира имеется устойчивая тенденция к снижению заболеваемости раком желудка. Например, в таких странах, как США среди причин смерти от злокачественных новообразований рак желудка находится на тринадцатом месте. Однако в развивающихся странах рак желудка продолжает лидировать, занимая второе место среди причин летальности от онкологических заболеваний. В России показатели заболеваемости одни из самых высоких в мире, так заболеваемость раком желудка на 100 000 населения среди мужчин составляет 39, среди женщин – 18, для сравнения в США среди мужчин – 5, среди женщин – 2. Самые высокие показатели смертности зарегистрированы в Киргизии, России, Японии, низкие – в Европе, США. Так смертность от рака желудка на 100 000 населения в России составляет среди мужчин – 36, среди женщин – 15, а в Японии среди мужчин – 31, среди женщин – 14 [1, 2, 3, 4, 5]. Согласно статистическим данным, рак желудка ежегодно способствует гибели 10% женщин и 12% мужчин среди всех умерших от злокачественных опухолей. Рак желудка имеет низкие показатели выживаемости: в среднем в мире прогнозы пятилетней выживаемости равны 10-20%, максимальный показатель зарегистрирован в Японии – 53%, в Европе – 18%, в США – 21%. Такая тенденция обусловлена поздней диагностикой рака желудка, показатели выживаемости напрямую коррелируют со стадией заболевания. Для рака желудка характерна более частая частота встречаемости в регионах Восточной Сибири. В Сибирском Федеральном округе из 12 территориальных образований Красноярск и Красноярский край по показателям заболеваемости злокачественными опухолями занимает 6-7-е место, а рак желудка вышел на 5-е место (6,3%) среди новообразований. В целом отмечается незначительное снижение общей заболеваемости раком желудка в регионе. Основное количество первичных больных с раком желудка – трудоспособные лица 55-60 лет. Провоцирующим фактором появления рака желудка являются атрофические изменения его слизистой оболочки. Метаплазия и дисплазия антрального отдела и тела желудка повышают вероятность развития злокачественного

заболевания. Таким образом, во всем мире проблема возникновения, прогрессирования рака желудка не решена. Иммунная система пациента активно борется при появлении опухолевого фактора. Роль врожденных клеток иммунной системы (нейтрофилов и моноцитов) в фагоцитозе антигенных детерминант регулирует весь иммунный ответ. С другой стороны, в прогрессировании злокачественного заболевания и развитии метастазов участвуют системы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты (АОЗ). Дисбаланс в сторону ПОЛ приводит к усилению процессов липопероксидации в мембранах клеток иммунной системы, способствуя их апоптозу, незавершенному фагоцитозу и разрастанию опухоли.

В связи с этим **целью нашего исследования** была оценка корреляционных взаимосвязей показателей ПОЛ-АОЗ и хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов при хроническом атрофическом гастрите и раке желудка [15, 16, 17, 18, 19].

Материалы и методы

Дизайн исследования включал следующие группы: 40 больных с хроническим гастритом (ХГ), 22 пациента с хроническим атрофическим гастритом (ХАГ), 40 больных с раком желудка (РЖ) и 50 практически здоровых добровольцев (без гастроэнтерологического анамнеза и изменений слизистой оболочки желудка по результатам фиброэзофагогастроуденоскопии) – контрольная группа. Всем больным, жителям Восточной Сибири, проведено комплексное клинико-лабораторное обследование. В исследовании принимали участие лица молодого, среднего и пожилого возраста (по классификации ВОЗ). Все изучаемые группы больных и практически здоровых лиц были сопоставимы по полу и возрасту.

Использовали хемилюминесцентный анализ спонтанной и индуцированной продукции активных форм кислорода нейтрофильными гранулоцитами и моноцитами для изучения их активности.

Оценивались следующие показатели: в спонтанном и зимозан-индуцированном состояниях временной интервал достижения максимальной интенсивности хемилюминесценции (Т),

значение максимальной величины свечения (I_{max}), общее количество активных форм кислорода, выраженных в виде площади под хемилюминесцентной кривой (S). В эксперименте хемилюминесценция усиливалась люминолом. Под индексом активации понимали отношение S индуцированной к S спонтанной.

Показатель ПОЛ (малоновый диальдегид – MDA) и факторы АОЗ (супероксиддисмутаза – SOD, каталаза – CAT, глутатион-S-трансфераза – GST, глутатионпероксидаза – GPO, церулоплазмин – CP) оценивали в плазме крови, используя спектрофотометрические подходы.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica v. 8.0 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения показателей определялась с помощью метода Колмогорова–Смирнова (с поправкой Лилефорса). Количественные показатели, учитывая нормальное распределение, описывались с использованием медианы (Me) и интерквартильного разброса ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для изучения статистической значимости различий между количественными признаками представленных групп применяли критерий Манна-Уитни. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Пирсону (r). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты

У больных хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом выявляется повышение хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, доказанные увеличением всех изучаемых показателей по сравнению с контрольной группой [13].

При хроническом атрофическом гастрите (с выраженной степенью атрофии слизистой оболочки желудка) обнаруживается максимальная хемилюминесцентная активность фагоцитов в спонтанном и индуцированном состояниях, которая проявляется в виде увеличения показателей максимальной интенсивности свечения, временного интервала достижения максимальной интенсивности, общего количества активных форм кислорода в спонтанном и индуцированном состояниях и отношения S индуц. к S спонт. по сравнению с контрольной группой.

У больных раком желудка снижается активность нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, при этом наибольшее количество и самые значимые изменения показателей хемилюминесцентной активности НГ и моноцитов выявлялись у больных раком желудка IV стадии. Не было выявлено статистически значимых различий в хе-

милюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов при хроническом гастрите, хроническом атрофическом гастрите и раке желудка в зависимости от пола и возраста обследуемых лиц.

Были выявлены следующие изменения показателей перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты у больных с заболеваниями желудка [11]. У больных хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом в плазме крови выявлено увеличение малонового диальдегида, активности супероксиддисмутаза, каталазы, глутатион-S-трансферазы, глутатионпероксидазы по сравнению с контрольной группой, кроме того, при ХАГ выявлялось повышение концентрации глутатион – S трансферазы по сравнению с больными ХГ. Таким образом, у больных хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом в плазме крови преобладают прооксидантные процессы, высокая активность антиоксидантных ферментов не может нивелировать действие большого количества активных форм кислорода, в результате уровень малонового диальдегида в 3,5 раза превышает контрольные значения в плазме крови. Не было выявлено статистически значимых отличий в показателях ПОЛ-АОЗ в плазме крови у больных хроническим атрофическим гастритом в зависимости от выраженности атрофических изменений слизистой оболочки желудка, в целом, несмотря на выраженную активацию ферментативного звена антиоксидантной системы, процессы липопероксидации в организме преобладают. Вероятно, окислительный стресс запускает деструкционные процессы в слизистой оболочки желудка и способствует прогрессированию атрофических изменений.

При изучении показателей прооксидантной и антиоксидантной систем у больных ХГ в возрасте 18-44 года (молодой возраст по классификации ВОЗ) в зависимости от пола получили следующие результаты. Содержание малонового диальдегида у женщин увеличивалось по сравнению с мужчинами идентичного возраста. Активность супероксиддисмутаза у женщин снижалась, а глутатион-S-трансферазы повышалась по сравнению с группой мужчин.

Содержание малонового диальдегида женщин с ХГ в возрасте 45-59 лет (средний возраст по классификации ВОЗ) повышалось по сравнению с группой мужчин аналогичного возраста. Активности каталазы и глутатионпероксидазы женщин снижались по сравнению с соответствующей группой мужчин.

У мужчин и женщин с ХГ в возрасте 60-74 лет (пожилой возраст по классификации ВОЗ) статистически значимых отличий параметров про-

оксидантной и антиоксидантной систем в плазме найдено не было.

При изучении показателей прооксидантной и антиоксидантной систем мужчин с ХГ в зависимости от возраста, получили следующие результаты. Единственный показатель – активность глутатионпероксидазы в группе мужчин в возрасте 45–59 лет была выше, по сравнению с мужчинами в возрасте от 18–44 года.

Содержание малонового диальдегида женщин с ХГ повышалось в возрасте 45–59 и 60–74 лет по сравнению с женщинами в возрасте 18–44 года.

Активность глутатион-S-трансферазы понижалась в группе женщин 60–74 лет по сравнению с женщинами в возрасте от 45–59 лет и повышалась в группе женщин 45–59 лет относительно женщин в возрасте от 18–44 лет. Активность супероксиддисмутазы увеличивалась в группе женщин в возрасте 60–74 лет по сравнению со всеми исследуемыми группами женщин.

В группе больных с хроническим атрофическим гастритом статистически значимых различий показателей прооксидантной и антиоксидантной систем в плазме крови в зависимости от пола и возраста выявлено не было.

При изучении параметров прооксидантной и антиоксидантной систем у больных с раком желудка нами были сформированы следующие группы: мужчины и женщины в возрасте 45–59 лет и 60–74 года. Содержание малонового диальдегида увеличивалось у женщин в возрасте 45–59 лет по сравнению с группой мужчин аналогичного возраста. Не было выявлено статистически значимых различий показателей прооксидантной и антиоксидантной систем в плазме больных с раком желудка в возрасте 60–74 в зависимости от пола [12].

Таким образом, у всех больных изучаемых групп происходят однонаправленные изменения в про- и антиоксидантной системе в плазме крови, преобладают процессы липопероксидации. Обнаружено, что окислительный стресс, вероятно, способствует увеличению гистодеструктивных изменений в слизистой оболочке желудка, содействуя прогрессированию патологического процесса и его выраженности. Были выявлены статистически значимые отличия параметров про- и антиоксидантной систем у пациентов хроническим гастритом и раком желудка в зависимости от пола и возраста.

У всех больных РЖ независимо от стадии в плазме крови диагностировался окислительный стресс в виде многократного повышения уровня малонового диальдегида. Активация ферментативного звена антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы и каталазы), глутатионового звена (глутатион-S-трансферазы и глутатионпе-

роксидазы), антиоксидантного белка (церулоплазмина) не компенсируют его проявления, поэтому доминирующие процессы липопероксидации, вероятно, только способствуют прогрессированию злокачественного заболевания.

Для анализа внутри- и межсистемных отношений в контрольной группе, больных хроническим атрофическим гастритом и раком желудка был проведен корреляционный анализ.

Проведенное исследование показало наличие в контрольной группе 5 положительных статистически значимых корреляционных связей, в группе больных ХАГ – 8 положительных, в группе больных РЖ – 4 положительных.

В контрольной группе было установлено 5 зависимостей: положительные корреляционные связи между I_{max} при спонтанной ХЛ нейтрофильных гранулоцитов и MDA ($r = 0,82$; $p = 0,03$), S_{max} при спонтанной ХЛ моноцитов и MDA ($r = 0,73$; $p = 0,013$), S_{max} при индуцированной ХЛ НГ и MDA ($r = 0,71$; $p = 0,04$), I_{max} при индуцированной ХЛ НГ и SOD ($r = 0,72$; $p = 0,03$), I_{max} при индуцированной ХЛ моноцитов и CP ($r = 0,84$; $p = 0,003$) (табл. 1). Данные связи являются закономерными, логичными и свидетельствуют о влиянии хемилюминесцентной активности НГ и моноцитов на количество образованных ими активных форм кислорода, о закономерностях между влиянием активных форм кислорода на показатели окислительного стресса, активность фермента антиоксидантной защиты и антиоксидантного белка.

В группе больных ХАГ происходит увеличение количества связей, выявляются положительные корреляционные зависимости между I_{max} при спонтанной ХЛ нейтрофильных гранулоцитов и MDA ($r = 0,62$; $p = 0,004$), между I_{max} при спонтанной ХЛ моноцитов и MDA ($r = 0,91$; $p = 0,003$), I_{max} при индуцированной ХЛ НГ и SOD ($r = 0,82$; $p = 0,005$), I_{max} при индуцированной ХЛ моноцитов и SOD ($r = 0,72$; $p = 0,001$), S_{max} при индуцированной ХЛ НГ и CAT ($r = 0,64$; $p = 0,002$), S_{max} при индуцированной ХЛ моноцитов и CAT ($r = 0,58$; $p = 0,01$), I_{max} при индуцированной ХЛ НГ и MDA ($r = 0,54$; $p = 0,03$), I_{max} при индуцированной ХЛ НГ и CAT ($r = 0,57$; $p = 0,002$) (табл. 2). Данные закономерности указывают, что в условиях хронического атрофического гастрита происходит активация клеток иммунной защиты (нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов), а патогенетические особенности самого заболевания (инфицирование *H. pylori*, развитие атрофии и других диспластических процессов в слизистой оболочке желудка) способствуют развитию окислительного стресса, который, вероятно, усугубляет течение заболевания.

ТАБЛИЦА 1. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ – АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ИММУННОЙ РЕГУЛЯЦИИ В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ

TABLE 1. CORRELATION RELATIONS OF LIPID PEROXIDATION INDICATORS – ANTIOXIDANT PROTECTION AND IMMUNE REGULATION IN THE CONTROL GROUP

Иммунологический показатель Immunological indicator	Показатель ПОЛ-АОЗ Indicator lipid peroxidation – antioxidant protection	r	p
Imax при спонтанной ХЛ НГ Imax with spontaneous CL NG	MDA	0,82	0,03
Smax при спонтанной ХЛ моноцитов Smax in spontaneous CL monocytes	MDA	0,73	0,013
Smax при индуцированной ХЛ НГ Smax with induced CL NG	MDA	0,71	0,04
Imax при индуцированной ХЛ НГ Imax with induced CL NG	SOD	0,72	0,03
Imax при индуцированной ХЛ моноцитов Imax in induced CL monocytes	CP	0,84	0,003

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ – АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ИММУННОЙ РЕГУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ АТРОФИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ

TABLE 2. CORRELATION RELATIONS OF LIPID PEROXIDATION INDICATORS – ANTIOXIDANT PROTECTION AND IMMUNE REGULATION IN PATIENTS WITH CHRONIC ATROPHIC GASTRITIS

Иммунологический показатель Immunological indicator	Показатель ПОЛ-АОЗ Indicator lipid peroxidation – antioxidant protection	r	p
Imax при спонтанной ХЛ НГ Imax with spontaneous CL NG	MDA	0,62	0,004
Imax при спонтанной ХЛ моноцитов Imax in spontaneous CL monocytes	MDA	0,91	0,003
Imax при индуцированной ХЛ НГ Imax with induced CL NG	SOD	0,82	0,005
Imax при индуцированной ХЛ моноцитов Imax in induced CL monocytes	SOD	0,72	0,001
Smax при индуцированной ХЛ НГ Smax with induced CL NG	CAT	0,64	0,002
Smax при индуцированной ХЛ моноцитов Smax induced by CL monocytes	CAT	0,58	0,01
Imax при индуцированной ХЛ НГ Imax with induced CL NG	MDA	0,54	0,03
Imax при индуцированной ХЛ НГ Imax with induced CL NG	CAT	0,57	0,002

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ – АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ИММУННОЙ РЕГУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

TABLE 3. CORRELATION RELATIONS OF LIPID PEROXIDATION OXIDATION – ANTIOXIDANT PROTECTION AND IMMUNE REGULATION IN PATIENTS WITH GASTRIC CANCER

Иммунологический показатель Immunological indicator	Показатель ПОЛ-АОЗ Indicator lipid peroxidation – antioxidant protection	r	p
Imax при спонтанной ХЛ НГ Imax with spontaneous CL NG	MDA	0,68	0,03
Imax при спонтанной ХЛ моноцитов Imax in spontaneous CL monocytes	MDA	0,43	0,014
Imax при индуцированной ХЛ НГ Imax with induced CL NG	MDA	0,55	0,05
Imax при спонтанной ХЛ моноцитов Imax in spontaneous CL monocytes	SOD	0,81	0,03

В группе больных раком желудка происходит уменьшение количества связей, выявляются положительные корреляционные зависимости между Imax при спонтанной ХЛ НГ и MDA ($r = 0,68$; $p = 0,03$), Imax при спонтанной ХЛ моноцитов и MDA ($r = 0,43$; $p = 0,014$), Imax при индуцированной ХЛ НГ и MDA ($r = 0,55$; $p = 0,05$), Imax при спонтанной ХЛ моноцитов и SOD ($r = 0,81$; $p = 0,03$) (табл. 3). Выявленные взаимодействия закономерны, так как направлены на элиминацию опухоли и предотвращение деструктивных изменений в слизистой оболочке желудка.

Обсуждение

Проведенное исследование подтвердило, что при хроническом атрофическом гастрите и раке желудка выявляются выраженные нарушения в иммунной, прооксидантной и антиоксидантной системах. При ХАГ выявляется активация неспецифического звена иммунитета, повышение активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, доказанная увеличением показателей максимальной интенсивности, временного интервала достижения максимальной интенсивности и общим количеством активных форм кислорода при спонтанной и индуцированной хемилюминесценции, при этом хемилюминесцентная активность НГ выше, чем у моноцитов. Активация иммунитета при предраковом состоянии желудка направлена на уничтожение *H. pylori*-инфекции и выраженных атрофических изменений СОЖ. Чем более выражена атрофия СОЖ при ХАГ, тем выше значения показателей. При раке желудка выявляется противоположная картина, сниже-

ние активности неспецифического звена, угнетение функции НГ и моноцитов, проявляющиеся снижением максимальной интенсивности при увеличении времени выхода на максимум при спонтанной и индуцированной хемилюминесценции. Если предположить, что данные патологические процессы взаимосвязаны, что ХАГ может трансформироваться в РЖ, то на стадии ХАГ выявляется напряжение, а при РЖ – истощение внутренних резервов клеток иммунной системы. Это подтверждается увеличением корреляционных связей при ХАГ и уменьшением их при РЖ. Не исключено, что изменениям в иммунной системе способствует окислительный стресс в плазме крови, проявляющийся в виде увеличения малонового диальдегида, при ХАГ – в 5 раз, при РЖ I стадии – в 50 раз, при РЖ IV стадии – в 90 раз от контроля. При ХАГ происходит активация ферментативного звена АОЗ для компенсации увеличенных показателей MDA. С другой стороны, при РЖ снижается активность ведущего фермента АОЗ – супероксиддисмутазы и фермента в борьбе с интоксикацией – глутатионпероксидазы, компенсаторно повышается антиоксидантный белок – церулоплазмин. Наибольшее количество изменений во всех изучаемых системах выявляется при РЖ IV стадии, при РЖ женщин в возрасте 45-59 лет, так как в этот период гормональная перестройка организма дополнительно влияет на процессы ПОЛ-АОЗ. Результаты нашего исследования согласуются с современными представлениями о канцерогенезе, где хронический атрофический гастрит и рак желудка – звенья одного патогенетического каскада Correa [4, 5, 16]. Проведенное исследование подтвердило,

что при всех изучаемых заболеваниях желудка действует перманентный окислительный стресс, на который на стадии хронического гастрита и хронического атрофического гастрита организм реагирует усилением активности ферментов антиоксидантной системы, усилением активности нейтрофилов и моноцитов, а на стадии рака желудка — компенсаторные возможности больного организма ослабевают, функция нейтрофилов и моноцитов снижается. Следовательно, выявление больных с хроническим атрофическим гастритом и раком желудка на ранних стадиях (I-II)

и проведенное лечение поможет прервать патогенетический каскад изменений, возникающий при данных патологических состояниях.

Благодарности

Проект «Разработка и внедрение программно-го комплекса скрининга и ранней диагностики рака желудка по показателям иммунной, прооксидантной и антиоксидантной систем для снижения показателей смертности и инвалидизации населения» проведен при поддержке Красноярского краевого фонда науки.

Список литературы / References

1. Бордин Д.С., Машарова А.А., Хомерики С.Г. Хронический гастрит: современный взгляд на старую проблему // Сучасна гастроентерологія, 2013. № 1 (69). С. 72-79. [Bordin D.S., Masharova A.A., Khomeriki S.G. Chronic gastritis: a modern view of the old problem. *Suchasna gastroenterologiya = Modern Gastroenterology*, 2013, no. 1 (69), pp. 72-79. (In Russ.)]
2. Вернигородский С.В. Особенности структурных изменений слизистой оболочки желудка при хроническом гастрите у лиц разных возрастных групп // Клиническая и экспериментальная морфология, 2014. № 1 (9). С. 4-7. [Vernigorodsky S.V. Features of structural changes in the gastric mucosa in chronic gastritis in individuals of different age groups. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya = Clinical and Experimental Morphology*, 2014, no. 1 (9), pp. 4-7. (In Russ.)]
3. Волкова Н.Н. Факторы риска развития хронического атрофического гастрита (литературный обзор) // Русский медицинский журнал, 2013. Т. 21, № 31. С. 1617-1620. [Volkova N.N. Risk factors for the development of chronic atrophic gastritis (literature review). *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2013, Vol. 21, no. 31, pp. 1617-1620. (In Russ.)]
4. Денисов Н.Л., Ивашкин В.Т., Лобзин Ю.В. Хронический гастрит с позиций взаимодействия иммунного, инфекционного и морфологического факторов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии, 2008. Т. 18, № 6. С. 22-27. [Denisov N.L., Ivashkin V.T., Lobzin Yu.V. Chronic gastritis from the perspective of the interaction of immune, infectious and morphological factors. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Coloproctology*, 2008, Vol. 18, no. 6, pp. 22-27. (In Russ.)]
5. Лазебник Л.Б., Васильев Ю.В., Щербakov П.Л., Хомерики С.Г., Машарова А.А., Бордин Д.С., Касьяненко В.И., Дубцова Е.А. *Helicobacter pylori*: распространенность, диагностика, лечение // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2010. № 2. С. 3-7. [Lazebnik L.B., Vasiliev Yu.V., Scherbakov P.L., Khomeriki S.G., Masharova A.A., Bordin D.S., Kasyanenko V.I., Dubtsova E.A. *Helicobacter pylori*: prevalence, diagnosis, treatment. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2010, no. 2, pp. 3-7. (In Russ.)]
6. Модестов А.А., Сафонцев И.П., Зуков Р.А., Слепов Е.В., Клименок М.П., Гаас Е.Н. Онкологическая заболеваемость в Красноярском крае // Российский онкологический журнал, 2016. № 21 (1-2). С. 76-80. [Modestov A.A., Safontsev I.P., Zukov R.A., Slepov E.V., Klimentok M.P., Gaas E.N. Oncological incidence in the Krasnoyarsk Territory. *Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal = Russian Oncology Journal*, 2016, no. 21 (1-2), pp. 76-80. (In Russ.)]
7. Павлович И.М., Гордиенко А.В., Бацков С.С., Лавренчук Д.В. Влияние *Helicobacter pylori* на морфологическое состояние слизистой оболочки желудка при хроническом гастрите // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях, 2013. № 2. С. 32-35. [Pavlovich I.M., Gordienko A.V., Butskov S.S., Lavrenchuk D.V. The effect of *Helicobacter pylori* on the morphological state of the gastric mucosa in chronic gastritis. *Mediko-biologicheskie i sotsialno-psikhologicheskie problemy bezopasnosti v chrezvychaynykh situatsiyakh = Medical-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations*, 2013, no. 2, pp. 32-35. (In Russ.)]
8. Скворцов В.В., Скворцова Е.М. Актуальные вопросы диагностики и лечения антрального гастрита типа В // Поликлиника, 2012. № 1.1. С. 102-106. [Skvortsov V.V., Skvortsova E.M. Actual issues of diagnosis and treatment of antral gastritis type B. *Poliklinika = Clinic*, 2012, no. 1.1, pp. 102-106. (In Russ.)]
9. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Савченко А.А. Особенности клинических проявлений и характеристика иммунопатогенеза больных хроническим миелолойкозом // Сибирский онкологический журнал, 2007. № 3. С. 16-22. [Smirnova O.V., Manchuk V.T., Savchenko A.A. Features of clinical manifestations and immunopathogenesis characteristics of patients with chronic myelogenous leukemia. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Oncology Journal*, 2007, no. 3, pp. 16-22. (In Russ.)]

10. Смирнова О.В., Титова Н.М., Манчук В.Т., Елманова Н.Г. Особенности цитокиновой регуляции у больных механической желтухой различного генеза // *Современные проблемы науки и образования*, 2015. № 4. С. 425. [Smirnova O.V., Titova N.M., Manchuk V.T., Elmanova N.G. Features of cytokine regulation in patients with obstructive jaundice of various genesis. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2015, no. 4, p. 425. (In Russ.)]
11. Смирнова О., Цуканов В., Синяков А., Москаленко О., Елманова Н., Овчаренко Е., Титова Н. Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты при хроническом атрофическом гастрите, ассоциированном с *Helicobacter pylori* // *Врач*, 2019. Т. 30, № 11. С. 41-45. [Smirnova O., Tsukanov V., Sinyakov A., Moskalenko O., Elmanova N., Ovcharenko E., Titova N. Indicators of lipid peroxidation and antioxidant protection in chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori*. *Vrach = Doctor*, 2019, Vol. 30, no. 11, pp. 41-45. (In Russ.)]
12. Смирнова О.В., Цуканов В.В., Модестов А.А., Синяков А.А., Москаленко О.Л., Елманова Н.Г., Овчаренко Е.С., Титова Н.М. Промежуточная оценка результатов клинического исследования закономерностей изменений процессов перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты при раке желудка // *Фарматека*, 2019. Т. 26, № 12. С. 50-55. [Smirnova O.V., Tsukanov V.V., Modestov A.A., Sinyakov A.A., Moskalenko O.L., Elmanova N.G., Ovcharenko E.S., Titova N.M. An intermediate assessment of the results of a clinical study of the patterns of changes in lipid peroxidation processes – antioxidant protection in gastric cancer. *Farmateka = Farmateka*, 2019, Vol. 26, no. 12, pp. 50-55. (In Russ.)]
13. Смирнова О.В., Цуканов В.В., Синяков А.А., Москаленко О.Л., Елманова Н.Г., Овчаренко Е.С., Каспарова И.Э. Показатели хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов при *Helicobacter pylori*, ассоциированном раке желудка // *Сибирский журнал естественных наук и сельского хозяйства*, 2019. Т. 11, № 2. С. 139-154. [Smirnova O.V., Tsukanov V.V., Sinyakov A.A., Moskalenko O.L., Elmanova N.G., Ovcharenko E.S., Kasparova I.E. Indicators of the chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in *Helicobacter pylori* associated gastric cancer. *Sibirskiy zhurnal estestvennykh nauk i selskogo khozyaystva = Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2019, Vol. 11, no. 2, pp. 139-154. (In Russ.)]
14. Степанов Ю.М., Симонова Е.В. Повышение информативности эндоскопической диагностики предракowych изменений и рака желудка у больных с атрофическим гастритом // *Гастроэнтерология*, 2013. № 4 (50). С. 23-33. [Stepanov Yu.M., Simonova E.V. Increasing the information content of endoscopic diagnosis of precancerous changes and gastric cancer in patients with atrophic gastritis. *Gastroenterologiya = Gastroenterology*, 2013, no. 4 (50), pp. 23-33. (In Russ.)]
15. Adamu M.A., Weck M.N., Rothenbacher D., Brenner H. Incidence and risk factors for the development of chronic atrophic gastritis: five year follow up of a population based cohort study. *Int. J. Cancer*, 2011, Vol. 128, pp. 1652-1658.
16. Correa P. Gastric cancer: overview. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 2013. Vol. 42, no. 2, pp. 211-217.
17. Graham D.Y. *Helicobacter pylori* update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. *Gastroenterology*, 2015, Vol. 148, no. 4, pp. 719-731.
18. Watari J., Chen N., Amenta P.S., Fukui H. *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. *World J. Gastroenterol.*, 2014. Vol. 20, no. 18, pp. 5461-5473.
19. Yoshida T., Kato J., Inoue I., Yoshimura N., Deguchi H., Mukoubayashi C., Oka M., Watanabe M., Enomoto S., Niwa T., Maekita T., Iguchi M., Tamai H., Utsunomiya H., Yamamichi N., Fujishiro M., Iwane M., Takeshita T., Ushijima T., Ichinose M. Cancer development based on chronic active gastritis and resulting gastric atrophy as assessed by serum levels of pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody titer. *Int. J. Cancer*, 2014, Vol. 134, no. 6, pp. 1445-1457.

Авторы:

Смирнова О.В. — д.м.н., заведующая лабораторией клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Цуканов В.В. — д.м.н., профессор, заведующий клиническим отделением патологии пищеварительной системы у взрослых и детей, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Authors:

Smirnova O.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Tsukanov V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Clinical Department of Digestive Disorders in Adults and Children, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Синяков А.А. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Sinyakov A.A., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Москаленко О.Л. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Moskalenko O.L., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Елманова Н.Г. — младший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Elmanova N.G., Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Овчаренко Е.С. — младший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Ovcharenko E.S., Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 20.04.2020
Отправлена на доработку 30.04.2020
Принята к печати 01.05.2020

Received 20.04.2020
Revision received 30.04.2020
Accepted 01.05.2020

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА *IL13* В РАЗВИТИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

Терещенко С.Ю.¹, Смольникова М.В.¹, Каспаров Э.В.¹,
Шахтшнейдер Е.В.², Малинчик М.А.¹, Коноплева О.С.^{1,3},
Смирнова С.В.¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, г. Красноярск, Россия

² Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал ФИЦ «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Красноярск, Россия

³ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Резюме. Бронхиальная астма – многофакторное заболевание, на его развитие влияют как факторы окружающей среды, так и генетическая предрасположенность человека. Получен ряд ассоциативных связей полиморфизма генов цитокинов, продуцируемых разными видами клеток иммунной системы, с развитием бронхиальной астмы. Интерлейкин-13 участвует в аллергическом воспалении, повышении гиперчувствительности бронхов, уровня эозинофилов и продукции IgE В-клетками, что делает перспективным изучение полиморфизмов *IL13* при бронхиальной астме в зависимости от характера развития заболевания. В работе проведено исследование возможной ассоциации между астмой и полиморфизмом *IL13* rs1800925 у детей европеоидного происхождения Восточной Сибири. Обследовано 4 группы больных астмой (средний возраст 12,8±1,2 лет): с контролируемым (n = 95) и неконтролируемым течением (n = 107), с тяжелой (n = 71) и среднетяжелой степенью тяжести (n = 131) заболевания. Контрольную группу составили практически здоровые индивиды: дети (n = 33) и взрослые (n = 102). Выделение ДНК проводилось сорбентным методом, генотипирование осуществлялось при помощи метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов (TagMan). Сравнение частот аллелей и генотипов проводили с помощью online-калькулятора, теста χ-квадрат. Отношение шансов (ОШ) с 95%-ным доверительным интервалом (ДИ) проводилось для связи генетических маркеров с фенотипами патологии. Показано, что генотип СТ *IL13* rs1800925 ассоциирован с бронхиальной астмой среднетяжелой степени и астмой с неконтролируемым течением заболевания, а генотип ТТ ассоциирован с астмой тяжелой степени тяжести. Таким образом, функциональный полиморфизм *IL13* rs1800925 (аллельный вариант Т* ассоциирован с повышенной экспрессией IL-13) ассоциирован с астмой у детей. Полученные нами данные согласуются с результатами других авторов. Так, Liu Z. и соавт. выявили ассоциацию между rs1800925 *IL13* и риском развития астмы у детей, так как генотипы СТ и ТТ встречались чаще в группе больных. Radhakrishnan A. и соавт., исследовав

Адрес для переписки:

Смольникова Марина Викторовна
Научно-исследовательский институт медицинских
проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел./факс: 8 (391) 228-06-81.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Address for correspondence:

Smolnikova Marina V.
Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan
Zheleznyak str., 3g.
Phone/fax: 7 (391) 228-06-81.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Образец цитирования:

С.Ю. Терещенко, М.В. Смольникова, Э.В. Каспаров,
Е.В. Шахтшнейдер, М.А. Малинчик, О.С. Коноплева,
С.В. Смирнова «Роль генетического полиморфизма
IL13 в развитии бронхиальной астмы у детей»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5.
С. 907-914.
doi: 10.15789/1563-0625-ROI-1986
© Терещенко С.Ю. и соавт., 2020

For citation:

S. Yu. Tereshchenko, M. V. Smolnikova, E. V. Kasparov,
E. V. Shakhshneider, M. A. Malinchik, O. S. Konopleva,
S. V. Smirnova "Role of *IL13* gene polymorphism in
development of bronchial asthma in children", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 5, pp. 907-914.
doi: 10.15789/1563-0625-ROI-1986
DOI: 10.15789/1563-0625-ROI-1986

rs1800925 *IL13* у взрослого населения Малайзии, выяснили, что частота аллеля T* в группе больных значительно превышает частоту этого аллеля в контрольной группе. Таким образом, результаты нашего исследования показали, что полиморфизм *IL13* rs1800925 ассоциирован с бронхиальной астмой у детей, а также уровнем ее контроля и степени тяжести заболевания.

Ключевые слова: бронхиальная астма, *IL13*, контроль заболевания, полиморфизм, степень тяжести заболевания, цитокины

ROLE OF *IL13* GENE POLYMORPHISM IN DEVELOPMENT OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN

Tereshchenko S.Yu.^a, Smolnikova M.V.^a, Kasparov E.V.^a,
Shakhtshneider E.V.^b, Malinchik M.A.^a, Konopleva O.S.^{a,c},
Smirnova S.V.^a

^a Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Abstract. Bronchial asthma is a multifactorial disease, with both environmental factors and genetic predisposal affecting its development. A number of gene associations have been obtained between polymorphisms of cytokine genes produced by different types of immune cells and asthma development. Interleukin-13 is involved in allergic inflammation, increased bronchial hypersensitivity, regulation of eosinophil levels and IgE production by B cells, thus making it promising for studying *IL13* gene polymorphisms in bronchial asthma coupled to development of the disease. The aim of this study was to investigate possible association between asthma and *IL13* rs1800925 polymorphism in the children of Caucasian origin in Eastern Siberia. Four groups of patients with asthma were examined (mean age 12.8±1.2 years): with a controlled (n = 95) and uncontrolled course (n = 107), with severe (n = 71) and moderate severity (n = 131) diseases. The control group consisted of healthy individuals: children (n = 33) and adults (n = 102). DNA was isolated with sorbent method; genotyping was carried out using RT-PCR using specific oligonucleotide primers and fluorescent TaqMan probes. The allele and genotype frequencies were compared by the χ -square test using an online calculator. The odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI) was performed to link genetic markers with pathological phenotypes. The CT *IL13* rs1800925 genotype was shown to be associated with moderate asthma and cases of uncontrollable clinical course, whereas the TT genotype was associated with severe asthma. Thus, rs1800925 polymorphism of *IL13* gene (the T* variant is known to be associated with increased IL-13 expression) may be associated with bronchial asthma in children. Our data are consistent with results of other authors. E.g., Liu Z. et al. revealed an association between rs1800925 *IL13* and the risk of developing asthma in children, with CT and TT genotypes being more common in the patient group. Radhakrishnan A. et al., was studied rs1800925 *IL13* in adult population of Malaysia and found that the T* allele frequency in the group of patients significantly exceeds the frequency of this allele in the control group. Thus, the results of our study showed that *IL13* rs1800925 polymorphism is associated with bronchial asthma in children, especially, with level of its control and severity of the disease.

Keywords: bronchial asthma, *IL13*, polymorphism, disease control, degree of severity, cytokines

Введение

Бронхиальная астма — хроническое воспалительное заболевание респираторного тракта, характеризующееся воспалением слизистой оболочки дыхательных путей, гиперпродукцией слизи, а также одышкой, хрипами и ремоделированием дыхательных путей [11]. Это одно из наиболее распространенных респираторных заболеваний. По данным Всемирной организации

здравоохранения, в настоящее время во всем мире от астмы страдают 235–330 миллионов человек, и примерно от 250 000 до 345 000 человек ежегодно умирают. Распространенность заболевания среди взрослого населения колеблется от 2,2 до 5–7%, а в детской популяции этот показатель составляет около 10% [2]. Бронхиальная астма является глобальной медико-социальной проблемой, которая нуждается в дальнейшем изучении механизмов

формирования ее тяжелых форм, а также поиска методов для контролирования течения заболевания.

Бронхиальная астма является многофакторным заболеванием, поскольку его развитию способствуют как факторы окружающей среды, так и генетическая предрасположенность человека [3, 11]. На март 2020 года, согласно системе Phenopedia (<https://phgkb.cdc.gov/PHGKB/startPagePhenoPedia.action>), в отношении бронхиальной астмы исследовано более 1400 генов, в том числе цитокинов и их рецепторов. Получен ряд ассоциативных связей полиморфизма генов цитокинов, продуцируемых различными иммунокомпетентными клетками с развитием бронхиальной астмы [6].

Интерлейкин 13 (IL-13) является центральным медиатором, участвующим в патогенезе бронхиальной астмы. Это белок, имеющий массу 13 кДа, его конформация представляет собой 4 альфа-спиральных пучка [13]. Рецептор IL-13 имеет в своем составе несколько субъединиц: IL4R α и субъединицу IL13R α 1 с низкой аффинностью, либо же субъединицу IL13R α 2 с высокой аффинностью. Продуцентами IL-13 являются множество клеток, к ним относятся тучные клетки, базофилы, эозинофилы, Th2 CD4⁺, Th1 CD4⁺, CD8⁺ клетки [13, 14]. Важнейшими функциями IL-13 являются увеличение дифференцировки бокаловидных клеток, активация фибробластов, повышение гиперчувствительности бронхов и продукция IgE В-клетками. Таким образом, были выявлены потенциальные биомаркеры активности IL-13, которые включают повышение уровней эозинофилов крови и мокроты, общего сывороточного IgE, белков, полученных из эпителия бронхов и выдыхаемого оксида азота [4]. В тканях бронхов у больных бронхиальной астмой происходит увеличение количества клеток, экспрессирующих мРНК IL-13, а гиперэкспрессия IL-13 в легких сопровождается развитием аллергического воспаления, гиперсекрецией слизи и гиперреактивностью дыхательных путей, субэпителиальным фиброзом и продукцией эотаксина [15]. В настоящее время в терапии бронхиальной астмы используется анти-IL-13 (коммерческое название «Лебрикизумаб»), представляющий из себя моноклональные антитела, блокирующие активность IL-13. При применении Лебрикизумаба у пациентов наблюдается значительное улучшение объема фиксированного выдоха за первую секунду маневра (ОФВ1) [4]. Таким образом, было установлено, что лечение Лебрикизумабом способствует улучшению функций легких.

Ген *IL13* располагается на хромосоме 5q31, состоит из 4589 пар нуклеотидов и содержит 6 экзо-

нов и 5 интронов. Этот ген, а также гены *IL3*, *IL4*, *IL5* и *CSF2* образуют кластер генов цитокинов на хромосоме 5q (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3596>). К тому же, ген *IL13* довольно тесно связан с геном *IL4*, а IL-13 имеет с IL-4 схожесть в аминокислотной последовательности до 30%. Помимо этого, оба этих интерлейкина способны вызывать одинаковые биологические ответы, поскольку они содержат общий компонент рецептора – IL4R α [14].

Ранее была изучена ассоциация бронхиальной астмы с некоторыми однонуклеотидными полиморфизмами гена *IL13*: rs1881457 (промоторный регион), rs1800925 (промоторный регион), rs2066960 (интрон 1), rs1295686 (интрон 3), rs20541 (экзон 4). Но особый интерес представляет изучение полиморфизма rs1800925 в связи с его локализацией в промоторной области гена *IL13*, а также выявленной ассоциации между этим однонуклеотидным полиморфизмом (ОНП) с бронхиальной астмой как у взрослого, так и детского населения [5, 7]. Однонуклеотидные замены в промоторном регионе гена могут модифицировать связывание фактора транскрипции и тем самым влиять на скорость транскрипции и экспрессию белка. У носителей гомозиготного варианта по минорному аллелю этого полиморфизма наблюдается ассоциация с повышенной продукцией IL-13, гиперреактивностью дыхательных путей и положительной реакцией кожного теста на аллерген, а гетерозиготы и гомозиготы по минорному аллелю связаны с повышенной концентрацией IgE. При одновременном носительстве у пациентов нескольких минорных аллелей ОНП в гене *IL13*, например, сочетания минорных аллелей rs20541 и rs1800925, может наблюдаться синергический эффект, в результате чего возникает гиперэкспрессия IL-13 в Th2 CD4⁺ клетках и его сверхактивность [3, 5].

Изучение полиморфизма *IL13*, в контексте участия в патогенезе БА с позиции контроля над заболеванием, представляется перспективным, так как IL-13 является одним из ключевых регуляторов иммунного ответа при аллергическом воспалении.

Цель настоящего исследования направлена на оценку ассоциации между полиморфизмом rs1800925 гена *IL13* и бронхиальной астмой с различным уровнем контроля и степенью тяжести заболевания у детей европеоидного происхождения Восточной Сибири.

Материалы и методы

Группу обследуемых составили дети, страдающие бронхиальной астмой (n = 202, средний возраст 12,8 \pm 1,2 лет) и практически здоровые дети и взрослые (n = 135) г. Красноярск. В контроль-

ную группу вошли дети ($n = 33$, средний возраст $13,6 \pm 2,5$ лет) и взрослые с отсутствием БА и аллергии в анамнезе ($n = 102$, средний возраст $38,3 \pm 5,4$ года). Был проведен сравнительный анализ частоты аллелей в контрольных группах разного возраста, статистически значимых отличий выявлено не было, что позволило объединить лица разного возраста в одну контрольную группу (см. табл. 1). Все больные дети были расформированы по группам: тяжелая/среднетяжелая БА с неконтролируемым течением заболевания (НБА, $n = 107$) и среднетяжелая БА с контролируемым течением заболевания (КБА, $n = 95$). Все участники или их родители дали письменное информированное согласие на проведение исследования. Протокол обследования больных и практически здоровых людей отвечал этическим нормам и был разрешен комитетом биомедицинской этики НИИ МПС (Протокол № 12 от 10.12.2013). Диагноз, степень тяжести и уровень контроля над течением заболевания установлен в соответствии с рекомендациями рабочей группы GINA (Global Initiative for Asthma, updated, 2018). Был использован тест по контролю над астмой (ACTm).

Все обследованные больные соответствовали общим критериям включения в исследование: диагноз «БА», тяжелое/среднетяжелое течение, отсутствие ОРВИ и других острых заболеваний на момент обследования, европеоидное происхождение (3 поколения). Критерии включения в группу контроля: практически здоровые индивиды, отрицательный аллергологический анамнез, уровень общего IgE < 100 МЕ/мл, европеоидное происхождение (3 поколения).

Материалом исследования послужила ДНК, выделенная из периферической крови с использованием набора DIAtom DNAPrep100 (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Генотипирование *IL13* (rs1800925) осуществлено при помощи метода ПЦР в режиме реального времени с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зон-

дов (TagMan) (ООО «ДНК-синтез», Россия) по протоколу производителя.

Частота встречаемости качественных признаков выражена в абсолютных и относительных значениях. Статистически значимыми считались различия на уровне значимости $p < 0,05$. Сравнение частоты аллелей и генотипов между группами проводили с помощью online-калькулятора, теста χ^2 -квадрат (http://gen-exp.ru/calculator_or.php). Отношение шансов (ОШ) с 95%-ным доверительным интервалом (ДИ) проводилось для ассоциации генетических маркеров с фенотипами патологии.

Результаты и обсуждение

Однонуклеотидные полиморфизмы в генах цитокинов ассоциированы с уровнем их концентрации в сыворотке крови, а это в свою очередь коррелирует с формированием контролируемого или неконтролируемого течения бронхиальной астмы, а также со степенью тяжести заболевания. Исходя из особенностей развития бронхиальной астмы у детей, важными для исследований являются гены, ответственные за гипериндукцию синтеза IgE, поскольку он является основным маркером атопии. Центральную роль в аллергическом воспалении играет IL-13, секретируемый Th2-лимфоцитами. Ключевыми свойствами IL-13 являются синтез В-лимфоцитами IgE, индукция бронхиальной гиперреактивности и гиперсекреции слизи, активация эозинофилов и привлечение их в очаг воспаления.

В данном исследовании изучена частота генотипов и аллелей rs1800925 гена *IL13* в сформированных клинических группах больных и в контрольной группе.

Полученная в ходе исследования частота аллелей rs1800925 гена *IL13* в контрольной группе соответствует распределению в европеоидных популяциях: частота аллеля С* – 75%, аллеля Т* – 25% (согласно ресурсу <http://www.ensembl.org>). Сравнение частоты аллелей и генотипов проведено между группой контроля, общей группой больных БА, группами, выделенными с уче-

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ГЕНОТИПОВ *IL13* (rs1800925) В РАЗНОВОЗРАСТНОЙ КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ, %

TABLE 1. FREQUENCIES OF GENOTYPES OF THE *IL13* (rs1800925) IN DIFFERENT AGES CONTROL GROUP, %

Генотип Genotypes	Группы Groups		ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	p
	Дети – контроль Children, control (n = 33)	Взрослые – контроль Adults, control (n = 102)		
СС	45,5	60,8	1,45 (0,78-2,69)	p = 0,24
СТ	48,5	32,4		
ТТ	6,0	6,8		

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ *IL13* (rs1800925) У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ КОНТРОЛЯ И СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ, %

TABLE 2. FREQUENCIES OF GENOTYPES AND ALLELES OF THE *IL13* (rs1800925) IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA WITH DIFFERENT LEVELS OF CONTROL AND SEVERITY OF DISEASE, %

	Группы Groups						ОШ (95 % ДИ) OR (95% CI)	p
	БА (1) BA (1) n = 202	НБА (2) Uncontrolled BA (2) n = 107	КБА (3) Controlled BA (3) n = 95	Тяжелая БА (4) Severe BA (4) n = 71	Среднетяжелая БА (5) Moderate BA (5) n = 131	Контроль (6) Control (6) n = 135		
Генотипы Genotypes								
CC	44,6	42,1	47,4	45,1	43,5	57,0	1,60 = 1,53 (1,08-2,15) 2,6 = 1,7 (1,15-2,52) 3,60 = 1,37 (0,90-2,06) 4,60 = 1,65 (1,06-2,56) 5,60 = 1,51 (1,03-2,19)	p _{1,6} = 0,02 p _{2,6} = 0,008 p _{3,6} = 0,14 p _{4,6} = 0,027 p _{5,6} = 0,033
CT	43,6	43,9	43,2	39,4	46,6	36,3		
TT	11,8	14,0	9,4	15,5	9,9	6,7		
Аллели Alleles								
C	66,4	64,1	68,9	64,8	66,8	75,2		
T	33,6	35,9	31,1	35,2	33,2	24,8		

том степени контроля над заболеванием (КБА и НБА) и между группами, выделенными с учетом степени тяжести заболевания (см. табл. 2).

При сравнении частоты генотипов rs1800925 нами было показано статистически значимое отличие частоты генотипов между больными БА и контрольной группой. Генотипы с аллелем T* встречаются чаще у больных по отношению к контролю (ОШ 1,53 (1,08-2,15)), что может говорить о том, что генотипы СТ и ТТ являются факторами риска развития БА. Сравнительный анализ частоты генотипов между группами КБА и группой контроля не показал статистически значимых отличий, несмотря на то что в группе с контролируемым течением заболевания частота генотипов с минорным аллелем выше по сравнению с контролем. При сравнении частоты генотипов между больными НБА со среднетяжелой степенью (n = 44) и НБА с тяжелой степенью заболевания (n = 64) не выявлено статистически значимых отличий.

Частота генотипа СТ у больных неконтролируемой формой и среднетяжелой степенью тяжести БА статистически значимо выше, чем в контрольной группе (46,93 и 46,6% против 36,3%, p = 0,008, p = 0,033 соответственно). Можно предположить, что этот генотип ассоциирован с БА среднетяжелой степени и БА с неконтролиру-

емым течением заболевания. Мы также получили статистически значимые отличия при сравнении частоты генотипа ТТ между группой контроля и группой с тяжелой степенью тяжести БА. Так, в группе с тяжелой степенью тяжести БА значительно чаще встречается гомозиготный генотип ТТ (15,49% против 6,7%, p = 0,027). Следовательно, этот генотип ассоциирован с прогрессированием патологии – развития бронхиальной астмы тяжелой степени тяжести.

В целом наши результаты соответствуют результатам предыдущих исследований об ассоциации бронхиальной астмы с полиморфизмом rs1800925 гена *IL13*. По данным Zhigang L. и соавт., была выявлена ассоциация между полиморфизмом rs1800925 *IL13* и риском развития астмы у детей, поскольку генотипы СТ и ТТ по сравнению с генотипом СС, а также повышенный уровень экспрессии IL-13 в сыворотке крови, встречались чаще в группе больных. При дальнейшей стратификации исследования по этнической принадлежности, показан повышенный риск развития БА у европеоидов по сравнению с монголоидами [8]. Radhakrishnan и соавт. изучали влияние полиморфизма rs1800925 на риск развития БА у взрослого населения Малайзии. Оказалось, что процент минорного аллеля T* в группе больных превышает процент того же аллеля в

контроле, к тому же у пациентов с БА, гомозиготных по минорному аллелю или носителей гетерозиготного генотипа, наблюдался повышенный уровень сывороточного IL-13 по сравнению с теми же генотипами в контроле [12].

Эти и другие исследования подтверждают тот факт, что аллель T* полиморфизма rs1800925 является аллелем, ассоциированным с риском развития бронхиальной астмы у детей и взрослых в различных популяциях мира.

В развитии БА было отмечено участие и других полиморфизмов *IL13*. Так, например, Mei и соавт. провели мета-анализ, который показал ассоциацию rs20541 и риска развития БА. Результаты данного исследования показали, что данный полиморфизм в значительной степени ассоциирован с риском развития БА, у взрослых и детей с atopическим статусом в различных этнических группах Азии [10]. Проведенное Moffatt и соавт. в 2010 году исследование полногеномного поиска ассоциаций (GWAS), выявило, что полиморфизм *IL13* rs1295686 связан с риском развития астмы и общей концентрацией IgE в сыворотке крови [11]. В частности Maier и соавт. указали, что аллель T* был ассоциирован с более высоким уровнем IgE, чем аллель C*. Эти результаты указывают на критическую роль полиморфизма *IL13* rs1295686 в регуляции уровня IgE [9]. Поскольку IgE-зависимые механизмы играют важную роль в развитии и поддержании аллергического воспаления дыхательных путей при БА, вероятно, что этот полиморфизм, влияющий на уровень IgE, может влиять и на восприимчивость к БА.

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод о том, что ген *IL13* содержит функциональные полиморфизмы, способные влиять на его экспрессию, тем самым влияя на предрасположенность к многофакторным заболеваниям. Поэтому в многочисленных исследованиях изучалась возможная роль полиморфизмов гена *IL13* относительно риска развития бронхиальной астмы [11, 15]. Ранее нами была установлена ассоциация полиморфизмов генов *IL2*, *IL4*, *IL17F*, *TNFA* с контролируемым и неконтролируемым течением БА [1]. Изучение функциональной значимости однонуклеотидного полиморфизма *IL13* rs1800925 показывает его ассоциацию с риском развития бронхиальной астмы, степени тяжести и контроля над заболеванием у детей.

Бронхиальная астма является классическим примером мультифакториального заболевания. Это подразумевает то, что она развивается под воздействием разнообразных факторов окружающей среды при наличии генетической предрасположенности человека.

Гены, играющие важную роль в развитии бронхиальной астмы, разделяют на несколько групп: гены атопии или гуморального иммунного ответа (*IL4*, *IL5*, *IL13*, *IL3*); гены рецепторных молекул (*IL4R α* , *ADR β 2*); гены-модификаторы (*GSTM1*, *GSTT1*, *NAT2*); гены факторов транскрипции (*STAT6*, *JAK1*, *JAK2*); гены, связанные с воспалением (*IL18*, *TNF α*); гены-эффекторы (*IL17*); гены, связанные с ремоделированием дыхательных путей (*ADAM33*, *DENND1B*); гены, связанные с чувствительностью к факторам окружающей среды (*GSMB*, *NOS3*).

В настоящем исследовании мы показали распределение частоты генотипов и аллелей полиморфизма *IL13* rs1800925 у больных БА детей г. Красноярск. Полиморфизм rs1800925 расположен в промоторной зоне гена *IL13*, а минорный аллель T* ассоциирован с уровнем экспрессии IL-13, а также с повышенным количеством IgE в сыворотке крови. Частота аллелей изученного полиморфизма совпадает с частотой в других европеоидных популяциях мира. В ходе исследования было установлено, что у больных БА частота генотипов полиморфизма rs1800925 соответствует частоте генотипов у больных БА в европейских популяциях и имеет статистически значимые отличия от группы контроля. Показано, что генотип СТ ассоциирован с БА среднетяжелой степени и БА с неконтролируемым течением заболевания. Также установлено, что у детей, больных тяжелой БА, гомозиготный генотип ТТ встречается значительно чаще, чем у практически здоровых, и может быть ассоциирован с риском развития бронхиальной астмы тяжелой степени.

Таким образом, полученные данные подтверждают тот факт, что цитокины, продуцируемые различными иммунокомпетентными клетками, играют важнейшую роль в патогенезе бронхиальной астмы, а некоторые однонуклеотидные варианты гена *IL13* ассоциированы с риском развития, течения и прогрессирования патологии.

Список литературы / References

1. Смольникова М.В., Фрейдин М.Б., Смирнова С.В. Гены цитокинов как генетические маркеры atopической бронхиальной астмы с контролируемым и неконтролируемым течением // Медицинская иммунология, 2017. Т. 5, № 19. С. 597-604. [Smolnikova M.V., Freidin M.B., Smirnova S.V. Cytokine genes as genetic markers of atopical bronchial asthma with a controlled and uncontrolled course. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 5, no. 19, pp. 597-604. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-605-614.

2. Черняк Б.А., Воржева И.И. Агонисты beta2-адренергических рецепторов в терапии бронхиальной астмы: вопросы эффективности и безопасности // Consilium Medicum, 2006. Т. 8, № 10. С. 66-72. [Chernyak B.A., Vorzheva I.I. Agonists of beta2-adrenergic receptors in the treatment of bronchial asthma: issues of efficacy and safety. *Consilium Medicum*, 2006, Vol. 8, no. 10, pp. 66-72. (In Russ.)]
3. Beghe B., Hall I.P., Parker S.G., Moffatt M.F., Wardlaw A., Connolly M.J., Fabbri L.M., Ruse C., Sayers I. Polymorphisms in IL13 pathway genes in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Allergy*, 2010, Vol. 65, no. 4, pp. 474-481.
4. Corren J. Role of interleukin-13 in asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2013, Vol. 13, no. 5, pp. 415-420.
5. Cui L., Jia J., Ma C.F., Li S.Y., Wang Y.P., Guo X.M., Li Q., Yu H.B., Liu W.H., Gao L.B. IL-13 polymorphisms contribute to the risk of asthma: a meta-analysis. *Clin. Biochem.*, 2012, Vol. 45, no. 4-5, pp. 285-288.
6. Georas S.N., Gue J., Fanis U.D., Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *Eur. Respir. J.*, 2005, Vol. 26, no. 6, pp. 933-947.
7. Hunninghake G.M., Soto-Quiros M.E., Avila L., Su J., Murphy A., Demeo D.L., Ly N.P., Liang C., Sylvia J.S., Klanderman B.J., Lange C., Raby B.A., Silverman E.K., Celedon J.C. Polymorphisms in IL13, total IgE, eosinophilia, and asthma exacerbations in childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 120, no. 1, pp. 84-90.
8. Liu Z., Li P., Wang J., Fan Q., Yan P., Zhang X., Han B. A meta-analysis of IL-13 polymorphisms and pediatric asthma risk. *Med. Sci. Monit.*, 2014, Vol. 20, pp. 2617-2623.
9. Maier L.M., Howson J.M., Walker N., Spickett G.P., Jones R.W., Ring S.M., McArdle W.L., Lowe C.E., Bailey R., Payne F., Todd J.A., Strachan D.P. Association of IL13 with total IgE: evidence against an inverse association of atopy and diabetes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 117, no. 6, pp. 1306-1313.
10. Mei Q., Qu J. Interleukin-13 +2044 G/A and +1923C/T polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians: a meta-analysis. *Medicine*, 2017, Vol. 96, no. 51, e9203. doi: 10.1097/MD.00000000000009203.
11. Moffatt M.F., Gut I.G., Demenais F., Strachan D.P., Bouzigon E., Heath S., von Mutius E., Farrall M., Lathrop M. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N. Engl. J. Med.*, 2010, Vol. 363, no. 13, pp. 1211-1221.
12. Radhakrishnan A.K., Raj V.L., Tan L.K., Liam C.K. Single nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-13 gene is associated with asthma in Malaysian adults. *Biomed Res. Int.*, 2013, Vol. 2013, 981012. doi: 10.1155/2013/981012.
13. Rael E.L., Lockey R.F. Interleukin-13 signaling and its role in asthma. *World Allergy Organ. J.*, 2011, Vol. 4, no. 3, pp. 54-64.
14. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol. Rev.*, 2004, Vol. 202, pp. 175-190.
15. Zhu Z., Homer R., Wang Z., Chen Q., Geba G., Wang J., Zhang Y., Elias J. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J. Clin. Invest.*, 1999, Vol. 103, no. 6, pp. 779-788.

Авторы:

Терещенко С.Ю. — д.м.н., профессор, заведующий клиническим отделением соматического и психического здоровья детей, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Смольникова М.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Authors:

Tereshchenko S. Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Clinical Department of Somatic and Mental Health in Children, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Smolnikova M.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Каспаров Э.В. — д.м.н., профессор, директор, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Шахтшнейдер Е.В. — к.м.н., заместитель руководителя по научной работе, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал ФИЦ «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Красноярск, Россия

Малинчик М.А. — аспирант, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Конopleва О.С. — к.м.н., младший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“»; ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Смирнова С.В. — д.м.н., профессор, руководитель научного направления, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Kasparov E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Shakhtshneider E.V., PhD (Medicine), Deputy Director For Research, Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Malinchik M.A., Graduate Student, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Konopleva O.S., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Krasnoyarsk State V. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Smirnova S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Scientific Direction, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 27.03.2020
Отправлена на доработку 06.05.2020
Принята к печати 11.05.2020

Received 27.03.2020
Revision received 06.05.2020
Accepted 11.05.2020

НЕКОТОРЫЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И ИХ КЛИНИКО- ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ

Супрун Е.Н.^{1,2}, Наговицына Е.Б.¹, Кудерова Н.И.¹, Супрун С.В.¹,
Лебедько О.А.¹

¹ Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, Хабаровский филиал ФГБНУ
«Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Хабаровск, Россия

² ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет», г. Хабаровск, Россия

Резюме. Распространенность бронхиальной астмы демонстрирует неизменный рост во всем мире в течение последних лет. Несмотря на все достижения аллергологии, контроля над заболеванием, даже при исключении всех социальных факторов риска и влияния сопутствующих заболеваний, удается достигнуть только у двух третей больных, в связи с чем возникает необходимость изучения эндогенных факторов, модифицирующих патогенез заболевания. Toll-подобные рецепторы являются основными молекулами распознавания патогенных паттернов в иммунной системе человека, поскольку любая аллергия является ошибкой распознавания, то мутация генов распознающих молекул может иметь непосредственное и разнонаправленное влияние на характер течения воспаления и его клинические проявления при бронхиальной астме. Для выявления этого влияния обследовано 65 пациентов с БА, выявлялись мутации генов Toll-рецепторов: TLR2-Arg753Glu, TLR4-Asp299Gly, TLR4-Ghr399Ile, TLR9-T1237C, TLR9-A2848G, субпопуляции лимфоцитов CD3, CD19, CD4, CD8, CD16, показатели фагоцитоза, уровни IgA, IgM, IgG, IgE и IL-6, IL-7, IL-9, оценка степени тяжести бронхиальной астмы и уровня ее контроля согласно критериям клинических рекомендаций по бронхиальной астме Минздрав РФ 2019 года. Нами показаны характерные клинические проявления исследованных мутаций. Выявлено более легкое течение заболевания, лучший ответ на терапию и более полный контроль над ним при однонуклеотидных заменах в генах Toll-подобных рецепторов 4 и 9 (TLR4-Asp299Gly, TLR4-Ghr399Ile, TLR9-T1237C, TLR9-A2848G) и, напротив, более тяжелое течение и худший ответ на терапию при мутации TLR2 с заменой Arg753Glu. В исследуемых группах определены особенности показателей иммунитета, характерные для генотипов с более легким и контролируемым течением БА: более высокое абсолютное число Т-хелперов при разнонаправленных изменениях числа Т-киллеров, но при таких генотипах неизменно сохраняется более высокое соотношение CD4/CD8. Также для них выявлены более высокие уровни показателей фагоцитоза, в первую очередь характеризующих хемотаксис, и IL-7, IL-9. Исключение составляет мутация TLR9-A2848G, при которой больший контроль заболевания и лучший ответ на терапию сочетаются с отсутствием изменений в изученных лабораторных признаках. При этом выявлена особенность генотипа исследованных пациентов с

Адрес для переписки:

Супрун Евгений Николаевич
Научно-исследовательский институт охраны
материнства и детства
680022, Россия, г. Хабаровск, ул. Воронежская, 49.
Тел.: 8 (914) 772-76-85.
Факс: 8 (4212) 70-05-91.
E-mail: evg-suprun@yandex.ru

Address for correspondence:

Suprun Evgeniy N.
Research Institute of Maternity and Childhood Protection
680022, Russian Federation, Khabarovsk,
Voronezhskaya str., 49.
Phone: 7 (914) 772-76-85.
Fax: 7 (4212) 70-05-91.
E-mail: evg-suprun@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.Н. Супрун, Е.Б. Наговицына, Н.И. Кудерова,
С.В. Супрун, О.А. Лебедько «Некоторые ассоциации
полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов
и их клинико-патогенетические проявления при
бронхиальной астме у детей» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 915-924.
doi: 10.15789/1563-0625-SGO-2049
© Супрун Е.Н. и соавт., 2020

For citation:

E.N. Suprun, E.B. Nagovitsyna, N.I. Kuderova, S.V. Suprun,
O.A. Lebed'ko "Some groups of Toll-like receptor gene
polymorphisms and their clinical and pathogenetic
manifestations in children with bronchial asthma", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 5, pp. 915-924.
doi: 10.15789/1563-0625-SGO-2049
DOI: 10.15789/1563-0625-SGO-2049

БА – сочетание мутаций Toll-подобных рецепторов 4 и 9. Это позволяет предположить наличие генетических паттернов, характеризующих группы пациентов с БА, различные по тяжести течения, ответу на терапию и степени контроля, что дает возможность персонализировать подходы к диагностике, профилактике и терапии заболевания.

Ключевые слова: Toll-подобные рецепторы, бронхиальная астма, дети, сигнальные молекулы, иммунный статус

SOME GROUPS OF TOLL-LIKE RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AND THEIR CLINICAL AND PATHOGENETIC MANIFESTATIONS IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA

Suprun E.N.^{a, b}, Nagovitsyna E.B.^a, Kuderova N.I.^a, Suprun S.V.^a,
Lebed'ko O.A.^a

^a Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch, Far Eastern Scientific Center for Physiology and Respiratory Pathology, Khabarovsk, Russian Federation

^b Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Abstract. The prevalence of bronchial asthma has shown its steady increase in the world in recent years. Despite all the achievements of Allergology, control of the disease can be achieved only in two-thirds of patients even if all social risk factors and the influence of concomitant diseases are excluded. Thus, it is necessary to study endogenous factors that modify the pathogenesis of the disease. Toll-like receptors are the main molecules for recognizing pathogenic patterns in the human immune system. Since any Allergy is a recognition error, mutation of the genes of the recognizing molecules can have a direct and multidirectional effect on the nature of the inflammation and its clinical manifestations in bronchial asthma (BA). To detect this effect, 65 patients with BA were examined, and mutations of Toll-like receptor genes were detected: TLR2-Arg753Glu, TLR4-Asp299Gly, TLR4-Ghr399Ile, TLR9-T1237C, TLR9-A2848G, lymphocyte subpopulations CD3, CD19, CD4, CD8, CD16, phagocytosis indicators, levels of IgA, IgM, IgG, IgE and IL-6, IL-7, IL-9. The assessment of the severity of asthma and its level of control were conducted according to clinical recommendations of the Ministry of health of the Russian Federation in 2019 criteria. We have shown characteristic clinical manifestations of the studied mutations. A lighter course of the disease, more complete control over it and a better response to therapy were found in single-nucleotide substitutions in the Toll-like receptor 4 and 9 (TLR4-Asp299Gly, TLR4-Ghr399Ile, TLR9-T1237C, TLR9-A2848G). On the contrary, a heavier course and a worse response to therapy were detected in the TLR2 mutation with Arg753Glu replacement. In the studied groups, the features of immunity indicators characteristic of genotypes with a lighter and more controlled course of BA were determined: a higher absolute number of T-helpers, with multidirectional changes in the number of T-killers, but with invariably preserved higher ratio of CD4/CD8 in such genotypes. Higher levels of phagocytosis indicators (primarily characterizing chemotaxis) and IL-7, IL-9 were also detected. The exception is the TLR9-A2848G mutation, in which greater disease control and better response to therapy are combined with no changes in the studied laboratory characteristics. At the same time, a specific feature of the genotype of the studied patients with BA was revealed – a combination of Toll-like receptors 4 and 9 mutations. This suggests the presence of genetic patterns that characterize groups of patients with BA that differ in severity, response to therapy, and degree of control, which makes it possible to personalize approaches to diagnosis, prevention, and therapy of the disease.

Keywords: Toll-like receptors, asthma, children, signaling molecules, immune status

Введение

В последние десятилетия отмечается рост распространенности бронхиальной астмы (БА), и к настоящему времени ее регистрация достигла 15% среди детской популяции населения Земли [15]. Россия в целом [9] и Хабаровский край в частности не составляют исключения из этой

тенденции, отмечен двукратный рост распространенности бронхиальной астмы среди детей Хабаровского края в период с 2005 по 2015 год (среди подростков с 12 до 24%, среди детей до 14 лет – с 11 до 18%) [6], при этом относительно более низкие официальные показатели распространенности заболевания в России (около 2% в России и 7-15% в индустриально развитых

странах) обусловлены методом учета по обращаемости, при исследованиях методом сплошного опроса (ISAAC) в различных регионах нашей страны астмоподобные симптомы выявляются у 4–15% детей, что соответствует показателям других индустриально развитых стран [3, 7]. Такое распространение бронхиальной астмы обусловлено, в первую очередь, изменением совокупного генотипа населения этих стран, вызванным кардинальной сменой образа жизни в последнем столетии, которое приводит к все более широкому распространению атопии вообще, и бронхиальной астмы в частности, в связи с чем оно практически не поддается коррекции. Исходя из этого, усилия медицинского сообщества направлены на повышение эффективности терапии бронхиальной астмы, а не на ее первичную профилактику. Тем не менее доля больных, у которых достигнут контроль бронхиальной астмы, не превышает 30%, полный контроль достигается лишь у 5% [15]. В России имеют место сходные соотношения [2]. Большую роль в неконтролируемом течении бронхиальной астмы играют приверженность пациентов базисной терапии, социальные факторы, в частности доступность лекарственных средств, образовательный уровень больных или их родителей, квалификации и доступность медицинского персонала, осуществляющего диспансерное наблюдение и контролирующего терапию, наличие и степень выраженности сопутствующих заболеваний. Однако даже при исключении этих факторов, когда базисная терапия осуществляется под непосредственным наблюдением специалиста согласно принятым схемам терапии, с бесплатным предоставлением препаратов и в группе больных бронхиальной астмой без значимой сопутствующей патологии полного контроля удается добиться лишь у 34% пациентов, хорошего — у 38 и 28% больных остается с неконтролируемым течением патологического процесса [19]. Можно предположить, что это обусловлено в том числе некоторыми эндогенными факторами, поиск которых становится особенно актуален.

Бронхиальная астма у детей — мультифакториальное заболевание, поэтому причины неконтролируемого течения весьма разнообразны, однако в ее основе всегда лежит атопическое воспаление. В свою очередь атопия является нарушением с полигенным наследованием, поэтому полиморфизмы системы генов, обуславливающих ее реализацию, представляют особый интерес, как базис различной реакции на провоцирующие и терапевтические воздействия в разных группах пациентов, страдающих БА [1, 4, 11]. Фенотипические проявления атопии зависят не от одной конкретной мутации, а от комплекса полимор-

физмов генов-предикторов. Поскольку в основе атопии вообще и БА в частности лежит нарушение распознавания типа антигена, то большой интерес для исследования представляют полиморфизмы генов, кодирующих белки распознавания (Toll-подобные рецепторы) [5, 22, 23, 24], еще более важно выделение конкретных генов предикторов, полиморфизм которых достоверно различается у пациентов с бронхиальной астмой разной степени тяжести и в группах контролируемого и неконтролируемого течения заболевания, а также их ассоциаций. Их обнаружение позволяет персонифицировать подход к первичной и вторичной профилактике бронхиальной астмы.

Целью работы является оценка полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов иммунной системы у детей с бронхиальной астмой и выявление их взаимосвязей с течением заболевания.

Материалы и методы

Обследовано 65 пациентов, проживающих в Приамурье, страдающих БА различной степени тяжести. Выявлялись следующие мутации с заменой нуклеотидов, кодирующих распознающие молекулы иммунной системы (Toll-подобные рецепторы): TLR2-Arg753Glu, TLR4-Asp299Gly, TLR4-Ghr399Ile, TLR9-T1237C, TLR9-A2848G. Определение полиморфизмов проводилось методом ПЦР с использованием для выделения ДНК и амплификации наборов НПФ Литех (Москва), учет продуктов амплификации проводился методом электрофореза в агарозном геле. Исследования лимфоидных популяций осуществляли на цитометре «FACSCalibur» Becton Dickinson. Панель моноклональных антител (BD) состояла из 7 параметров: CD3⁺/CD45⁺ (зрелые Т-лимфоциты), CD19⁺/CD45⁺ (зрелые В-лимфоциты), CD3⁺/CD4⁺/CD45⁺ (Т-хелперы/ индукторы), CD3⁺/CD8⁺/CD45⁺ (Т-киллеры/цитотоксические), CD3⁺/CD25⁺ (маркер лимфоцитарной активации), CD(16⁺56)/CD45⁺ (натуральные киллеры), CD3⁺/HLA-DR⁺ (активированные Т- и В-лимфоциты). Показатели активности нейтрофилов изучали в спонтанном и стимулированном тестах фагоцитарной активности с частицами латекса и в тестах восстановления НСТ в формазан («ФАН-тест», «НСТ-тест», «Реакомплекс», г. Чита). Для определения уровней IgA, IgM, IgG, IgE и IL-6, IL-7 и IL-9 в сыворотке крови применяли иммуноферментный метод с использованием тест-систем «Вектор-Бест» для IgA, IgM, IgG, IL-6, IL-7, IL-9 и «Хема-Медика» для IgE, определение проводилось посредством автоматического спектрофотометра Lazurite «Вектор-Бест». Оценка степени тяжести бронхиальной астмы и уровня ее контроля проводилась согласно критериям клинических рекомендаций Минздрава РФ

от 2019 года [8], в целях дальнейшей статистической обработки степень тяжести оценивалась в баллах: легкая интерметирующая астма – 1 балл, легкая персистирующая – 2 балла, персистирующая средней тяжести – 3 балла, персистирующая тяжелая астма – 4 балла. Оценка требуемой для обеспечения контроля дозы топического глюкокортикостероида проводилась по флутиказону с пересчетом иных препаратов по уровню биоэквивалентности. При статистическом анализе результатов исследования использовались стандартные методы вариантной статистики с применением пакета статистических программ: STATISTICA для Windows (версия 10.0).

Результаты

В ходе проведенных исследований нами выявлен ряд значимых клинико-патогенетических проявления мутаций паттерн-распознающих рецепторов.

Так, при сравнении пациентов, несущих мутацию TLR2-Arg753Glu и не имеющих оной, обнаружены следующие особенности (табл. 1).

Обладатели мутантного генотипа имеют более тяжелое течение бронхиальной астмы, требуют больших доз топических глюкокортикостероидов для поддержания контроля над заболеванием, для них характерно более высокое относительное содержание Т-киллеров и, соответственно, более низкое относительное содержание Т-хелперов, что подтверждается достоверной разницей в соотношении CD4/CD8, однако абсолютные показатели этих клеток не демонстрируют значимой разницы с группой нормального генотипа. В фагоцитарном звене иммунитета отмечается значимое снижение спонтанной фагоцитарной активности нейтрофилов в группе с мутантным генотипом, при отсутствии различий стимулированной фагоцитарной активности. Фагоцитарное число как спонтанное, так и стимулированное достоверно снижается на фоне данной мутации.

Наиболее значимыми из изученных в отношении течения бронхиальной астмы оказались мутации гена рецептора TLR4 (табл. 2). В первую очередь однонуклеотидная замена Asp299Gly, носители которой, страдающие бронхиальной астмой, демонстрируют целый ряд особенностей,

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНОЙ ЗАМЕНЫ TLR2-Arg753Glu

TABLE 1. CLINICAL AND PATHOGENETIC MANIFESTATIONS OF SINGLE-NUCLEOTIDE SUBSTITUTION TLR2-Arg753Glu

	Нормальный генотип Normal genotype	Мутантный генотип Mutant genotype	Достоверность (p) Accuracy (p)
Степень тяжести (в баллах) Severity (in points)	2,8	3,1	0,06
Доза ТГКС, требуемая для контроля заболевания, мкг TGC dose required for disease control, mcg	244,7	364,1	0,08
CD8, %	24,5	27,7	0,05
CD8, абсолютное число CD8, absolute number	647,7	728,3	0,3
CD4, %	36,8	33,08	0,09
CD4, абсолютное число CD4, absolute number	1057,2	835,5	0,3
CD4/CD8	1,6	1,25	0,05
ФАН спонтанный, % Spontaneous neutrophil phagocytic rate, %	89,4	83,6	0,05
ФАН стимулированный, % Triggered neutrophil phagocytic rate, %	92,2	93,0	0,7
ФЧ спонтанное, шт. Spontaneous phagocyte, number	6,7	4,5	0,008
ФЧ стимулированное, шт. Triggered phagocyte, number	7,8	6,0	0,04
IL-7, пг/мл IL-7, pg/ml	19,1	8,3	0,4
IL-9, пг/мл IL-9, pg/ml	3,0	1,2	0,3

ТАБЛИЦА 2. КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В ГЕНЕ TLR4-Asp299Gly И Ghr399Ile

TABLE 2. CLINICAL AND PATHOGENETIC MANIFESTATIONS OF SINGLE-NUCLEOTIDE SUBSTITUTION IN TLR4-Asp299Gly AND Ghr399Ile GENES

	Нормальный генотип Normal genotype	Мутантный генотип Mutant genotype	Достоверность (p) Accuracy (p)
Asp299Gly			
Степень тяжести (в баллах) Severity (in points)	3,0	2,6	0,02
Доза ТГКС, требуемая для контроля заболевания TGC dose required for disease control	311,8	176,1	0,02
Контролируемая БА, % Controlled BA, %	7,8	44	0,0007
CD8, %	24,4	27,1	0,07
CD8, абсолютное число CD8, absolute number	614,4	794,8	0,02
CD4, %	36,6	34,8	0,3
CD4, абсолютное число CD4, absolute number	911,1	1296,0	0,04
НСТ спонтанный, % Spontaneous NBT, %	17,2	29,6	0,09
НСТ стимулированный, % Triggered NBT, %	64,1	80,8	0,02
ФАН спонтанный, % Spontaneous neutrophil phagocytic rate, %	87,2	91,3	0,15
ФАН стимулированный, % Triggered neutrophil phagocytic rate, %	91,3	95,9	0,05
ФЧ спонтанное, шт. Spontaneous phagocyte, number	5,8	7,6	0,01
ФЧ стимулированное, шт. Triggered phagocyte, number	7,0	8,6	0,04
IL-7, пг/мл IL-7, pg/ml	15,1	22,0	0,6
IL-9, пг/мл IL-9, pg/ml	1,6	5,3	0,02
Ghr399Ile			
Контролируемая БА, % Controlled BA, %	22,2	37,5	0,3
IL-7, пг/мл IL-7, pg/ml	13,1	52,3	0,04
IL-9, пг/мл IL-9, pg/ml	2,2	6,3	0,08

в большей степени благоприятных. Так, у этой группы пациентов астма течет достоверно легче, требуется меньшая доза ТГКС для контроля над заболеванием, и главное, носители этой му-

тации по результатам наших исследований чаще достигают полного контроля над бронхиальной астмой. Для них характерен более высокий уровень Т-киллеров, как относительный, так и аб-

ТАБЛИЦА 3. КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В ГЕНЕ TLR9-T1237C И A2848G

TABLE 3. CLINICAL AND PATHOGENETIC MANIFESTATIONS OF SINGLE-NUCLEOTIDE SUBSTITUTION IN TLR9-T1237C AND A2848G GENES

	Нормальный генотип Normal genotype	Мутантный генотип Mutant genotype	Достоверность (p) Accuracy (p)
T1237C			
Степень тяжести (в баллах) Severity (in points)	2,9	2,6	0,05
Контролируемая БА, % Controlled BA, %	23,9	42,1	0,07
CD8, %	26,0	23,1	0,04
CD8, абсолютное число CD8, absolute number	684,5	613,6	0,4
CD4, %	35,3	38,0	0,1
CD4, абсолютное число CD4, absolute number	996,3	1031,2	0,8
CD4/CD8	1,4	1,8	0,03
Иммуноглобулин А, г/л Immunoglobulin A, g/l	1,4	1,8	0,04
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	0,03	0,6	0,04
IL-7, пг/мл IL-7, pg/ml	12,3	29,1	0,2
IL-9, пг/мл IL-9, pg/ml	2,4	3,5	0,4
A2848G			
Контролируемая БА, % Controlled BA, %	20,0	42,5	0,04

солютный и повышение абсолютного количества Т-хелперов, более высокие показатели фагоцитоза по всем критериям, как количественным, так и функциональным. Кроме того, в этой группе имеет место достоверное повышение уровня IL-9.

Что же касается носителей однонуклеотидной замены в гене TLR4 – Ghr399Ile, то они демонстрируют меньше значимых отличий, но при этом у них также отмечается тенденция к большей доли контролируемого течения заболевания. Однако отличий в тяжести течения БА и в дозе ТККС, необходимой для контроля над патологией, не выявлено, не обнаружено и различий в показателях иммунограммы, но у них имеет место более высокое содержание IL-7 и IL-9.

При исследованиях носителей некоторых мутаций в гене TLR9 (табл. 3) также отмечены их разнообразные клинико-патогенетические проявления, и одна из них, мононуклеотидная замена T1237C, оказалась более значима. Для ее носителей характерно более легкое течение

бронхиальной астмы, и они практически в два раза чаще полностью контролируют заболевание. В этой группе отмечается некоторое снижение доли Т-киллеров при отсутствии разницы в их абсолютном количестве, имеет место тенденция к росту доли Т-хелперов значимость которой подтверждают достоверные различия соотношения CD4/CD8. Пациенты, несущие эту мутацию, имеют достоверно более высокий уровень иммуноглобулина класса А и IL-6.

Особый интерес представляют обнаруженные нами клинические проявления мононуклеотидной замены в гене TLR9 – A2848G, носители этой мутации в два раза чаще имеют контролируемое течение бронхиальной астмы, при этом значимых различий ни по одному из других изучаемых признаков не выявлено.

При оценки взаимоотношения генов Toll-подобных рецепторов между собой, исследуемыми лабораторными показателями и клиническими проявлениями у детей с бронхиальной астмой обнаружена плотная сеть корреляций, в

частности сильная прямая, достоверная зависимость ($r = 0,79$) мутаций генов белка рецептора Toll 4 (TLR4-Asp299Gly) и (TLR4-Ghr399Ile), кроме того выявлена достоверная корреляционная связь средней силы ($r = 0,46$) мутаций гена белка рецептора Toll 4 (TLR4-Asp299Gly) и Toll 9 (TLR9-A2848G). Отмечаются достоверные обратная корреляционные связи однонуклеотидной замены TLR2-Arg753Glu и показателей фагоцитоза: ФАН спонтанный ($r = -0,27$), ФЧ спонтанное ($r = -0,35$), ФЧ стимулированное ($r = -0,28$) и достоверная прямая с дозой топического глюкокортикостероида, требуемого для достижения контроля ($r = 0,37$), достоверные прямые связи мутации TLR4 – Asp299Gly и абсолютного числа натуральных киллеров ($r = 0,29$), уровня НСТ стимулированного ($r = 0,32$), TLR9 A2848G с ОФВ₁ спонтанным ($r = 0,31$) и стимулированным бронхолитиком ($r = 0,37$).

Обсуждение

Toll-рецепторы являются основными молекулами распознавания патогенных паттернов в иммунной системе человека, активации каждого из них соответствует уникальный цитокиновый профиль, который и определяет направление борьбы иммунной системы с патогеном, несущим тот или иной паттерн. Поскольку любая аллергия, и атопия в частности, в своей основе является ошибкой распознавания, когда иммунная система воспринимает в качестве патогенного паттерна случайную белковую последовательность экзогенного или эндогенного происхождения, то мутация генов распознающих молекул может иметь непосредственное и разнонаправленное влияние на характер течения воспаления и его клинические проявления при бронхиальной астме. При этом следует отметить, что мутации могут приводить как к снижению специфичности и чувствительности рецепторов, так и к их повышению при чем в различных сочетаниях этих параметров. Полученные нами данные подтверждают наличие такого влияния для изучаемых мутаций Toll-подобных рецепторов [5, 22, 24].

Так, цитокиновый профиль активации TLR2 в целом соответствует Th1-типу реагирования [13, 16, 20] и мы видим смещение равновесия в сторону CD8⁺ клеток, что подтверждается как ростом их относительного числа, так и изменением соотношения CD4/CD8. Это позволяет предположить большую активность мутантного варианта рецептора, что может быть связано как с повышением его чувствительности, так и со снижением специфичности. При этом снижение показателей фагоцитоза, характеризующих активность хемотаксиса, и обратные корреляции с ними в

этой группе делают более вероятным предположение о снижении специфичности рецептора. На этом фоне мы видим более тяжелое течение бронхиальной астмы и более высокую потребность в топических глюкокортикостероидах у пациентов, носителей этой однонуклеотидной замены, однако значимого влияния на степень контроля при заболевании эта мутация не оказывает.

TLR4 считается IL-10 ассоциированным рецептором, его активация стимулирует Th2-тип иммунной реакции и, соответственно, должна усиливать атопическое воспаление [24]. Наиболее известная мутация в этом гене – мононуклеотидная замена Asp299Gly, для которой показана четкая зависимость с более высокой вероятностью поражения малярией [18], отсюда следует, что данная замена снижает активность рецептора, это позволяет предположить меньшую интенсивность атопического воспаления на фоне снижения стимуляции Th2-тип иммунной реакции. Действительно, в нашем исследовании, применительно к пациентам, страдающим бронхиальной астмой, обнаружены следующие проявления этой мутации, у больных этой группы выше абсолютное количество как Т-киллеров, так и Т-хелперов, но повышение Т-хелперов выражено сильнее, имеется положительная корреляционная связь с уровнем натуральных киллеров. Такие больные демонстрирует более высокий уровень всех показателей фагоцитоза и прямую достоверную корреляцию с ними, кроме того, у них отмечается более высокий уровень IL-9, влияние которого на бронхиальную обструкцию было ранее продемонстрировано на модели с мышами. И главное, именно пациенты, являющиеся носителями этой мутации, имеют наиболее легкое течение бронхиальной астмы, требует наименьшей дозы топических глюкокортикостероидов и чаще всего из всех исследованных контролируют течение своего заболевания.

Другая исследованная нами мутация в гене TLR4, однонуклеотидная замена Ghr399Ile приводит в исследуемой группе к схожим, но намного менее выраженным тенденциям в контроле заболевания и уровне IL-9, дополнительно у детей-носителей этой замены обнаруживается достоверно более высокий уровень IL-7, который в несколько большей степени стимулирует Th1-тип реагирования.

TLR9 реагирует на метилированные молекулы ДНК, то есть его возбуждают преимущественно паттерны внутриклеточных патогенов и активируемый им цитокиновый профиль соответствует Th1-типу реагирования [21, 22, 24]. В некоторых работах показана большая вероятность возникновения аутоиммунного процесса на фоне данной замены [17], что позволяет предпо-

ложить большую активность мутантного рецептора. Но в нашем исследовании у пациентов с однонуклеотидной заменой TLR9 – T1237C отмечалось снижение доли Т-киллеров и увеличение соотношения CD4/CD8 в популяциях лимфоцитов при более высоком уровне ИЛ-6. Также отмечается повышение уровня иммуноглобулина класса А, обеспечивающего локальную защиту от инфекции, в том числе в дыхательных путях, что может служить дополнительным, опосредованным фактором снижения тяжести бронхолегочной патологии. Клинические проявления БА в группе пациентов с этой заменой более легкие, и они чаще достигают контроля над заболеванием.

Отсутствие разницы в группах мутантного и нормального генотипа по исследуемым лабораторным показателям при мутации TLR9 A2848G в сочетании с достоверно более частым контролем над бронхиальной астмой в группе носителей этой замены и достоверными прямыми корреляционными связями мутации с уровнем ОФВ₁ и реакцией на бронхолитик ставит перед нами вопрос о механизмах ее воздействия на контролируемость бронхиальной астмы, исследованием которого мы планируем заниматься в дальнейшем.

Как отмечалось выше, большой интерес представляют не только отдельные мутации генов распознающих молекул, но и их сочетания, согласно результатам нашей работы на примере обследования детей Приамурья с БА, наиболее характерны сочетанные мутации генов TLR4, от результативной работы которого прямо зависит соотношение Th1 и Th2 типов иммунного ответа. Эти поражения часто сопровождаются мутацией Toll19, его активация усиливает вероятность отве-

та по Th1, и реципрокно угнетает Th2 и влияет на течение атопического воспаления при БА у детей.

Заключение

Таким образом, нами показано наличие характерных клинических проявлений исследованных мутаций паттерн-распознающих рецепторов. Выявлено более легкое течение заболевания, лучший ответ на терапию и более полный контроль над ним при однонуклеотидных заменах в генах Toll-рецепторов 4 и 9 (TLR4-Asp299Gly, TLR4-Ghr399Ile, TLR9-T1237C, TLR9-A2848G) и, напротив, более тяжелое течение и худший ответ на терапию при мутации TLR2 с заменой Arg753Glu. Кроме того, в исследуемых группах нами выявлены особенности показателей иммунитета, характерные для генотипов с более легким и контролируемым течением БА (за исключением мутации TLR9-A2848G): более высокое абсолютное число Т-хелперов, при разнонаправленных изменениях числа Т-киллеров, но при таких генотипах неизменно сохраняется более высокое соотношение CD4/CD8. Также для них выявлены более высокие уровни показателей фагоцитоза, в первую очередь характеризующих хемотаксис, и ИЛ-7, ИЛ-9. Для пациентов с бронхиальной астмой характерны сочетанные мутации Toll-подобных рецепторов 4 и 9.

Полученные нами данные позволяют предположить наличие генетических паттернов, характеризующих группы пациентов с БА различные по тяжести течения, ответу на терапию и степени контроля, что дает возможность персонализировать подходы к диагностике, профилактике и терапии заболевания.

Список литературы / References

1. Антонюк М.В., Гвозденко Т.А., Новгородцева Т.П., Виткина Т.И., Гельцер Б.И., Юренко А.В., Минева Е.Е., Кнышова В.В. Особенности цитокинового профиля у больных бронхиальной астмой в сочетании с ожирением // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 913-920. [Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A., Novgorodtseva T.P., Vitkina T.I., Geltser B.I., Yurenko A.V., Mineeva E.E., Knyshova V.V. Features of cytokine profile in patients with bronchial asthma combined with obesity. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 913-920. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-913-920.
2. Архипов В.В., Григорьева Е.В., Гавришина Е.В. Контроль над бронхиальной астмой в России: результаты многоцентрового наблюдательного исследования НИКА // Пульмонология, 2011. № 6. С. 87-93. [Arkhipov V.V., Grigoryeva E.V., Gavrishina E.V. Control of bronchial asthma in Russia: results of NIKA multicenter observational study. *Pulmonologiya = Pulmonology*, 2011, no. 6, pp. 87-93. (In Russ.)]
3. Батожаргалова Б.Ц., Мизерницкий Ю.Л., Подольная М.А. Метаанализ распространенности астмоподобных симптомов и бронхиальной астмы в России (по результатам программы ISAAC) // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2016. № 4. С. 59-69. [Batozhargalova B.T., Mizernitsky Yu.L., Podolnaya M.A. Meta-analysis of the prevalence of asthma-like symptoms and asthma in Russia (according to the results of ISAAC). *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2016, Vol. 61, no. 4, pp. 59-69. (In Russ.)]
4. Виткина Т.И., Новгородцева Т.П., Калинина Е.П., Лобанова Е.Г., Антонюк М.В. Иммунные механизмы формирования бронхиальной астмы контролируемого и частично контролируемого течения // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 495-502. [Vitkina T.I., Novgorodtseva T.P., Kalinina E.P., Lobanova E.G., Antonyuk M.V. Immune mechanisms for development of controlled and partially controlled asthma. *Meditsinskaya*

immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 495-502. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-495-502.

5. Ганковская Л.В., Намазова-Баранова Л.С., Порядин Г.В., Греченко В.В., Ганковский В.А., Алексеева А.А., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Брагвадзе Б.Г., Свитич О.А. Изменение показателей врожденного иммунитета при тяжелой бронхиальной астме у детей // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 99-106. [Gankovskaya L.V., Namazova-Baranova L.S., Poriadin G.V., Grechenko V.V., Gankovsky V.A., Alekseeva A.A., Salmashi Z.M., Kazimirsky A.N., Bragvadze B.G., Svitich O.A. Changes of innate immunity indexes in severe asthma in children. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 99-106. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-99-106.

6. Евсеева Г.П., Холодок Г.Н., Морозова Н.В., Супрун Е.Н., Козлов В.А., Лазарь К.Г. Эпидемиология бронхолегочных заболеваний детей и подростков Хабаровского края // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2016. Вып. 61. С. 31-35. [Evseeva G.P., Kholodok G.N., Morozova N.V., Suprun E.N., Kozlov V.K., Lazar K.G. Epidemiology of bronchopulmonary diseases in children and teenagers of Khabarovsk kray. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin of Respiratory Physiology and Pathology*, 2016, Vol. 61, pp. 31-35. (In Russ.)]

7. Камалтынова Е.М., Деев И.А., Белоногова Е.Г. Сравнительная эпидемиологическая характеристика бронхиальной астмы по данным программы «Международное исследование астмы и аллергии у детей» (International Study of Asthma and Allergy in Childhood) // Бюллетень сибирской медицины, 2009. № 4. С. 92-97. [Kamaltynova E.M., Deyev I.A., Belonogova E.G. Comparative epidemiological characteristics of bronchial asthma according to data of International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC). *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2009, no. 4, pp. 92-97. (In Russ.)]

8. Клинические рекомендации «Бронхиальная астма» [Электронный ресурс]. Министерство здравоохранения РФ, 2019. Режим доступа: http://spulmo.ru/upload/kr_bronhastma_2019.pdf. [Clinical recommendations "Bronchial asthma" [Electronic resource]. Ministry of Health of the Russian Federation, 2019. Access mode: http://spulmo.ru/upload/kr_bronhastma_2019.pdf].

9. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». 5-е изд., перераб. и доп. М.: Оригинал-макет, 2017. 160 с. [National program "Bronchial asthma in children. Treatment strategy and prevention". 5th ed., reprint and add.]. Moscow: Original-maket, 2017. 160 p.

10. Смольникова М.В., Фрейдin М.Б., Смирнова С.В. Гены цитокинов как генетические маркеры атопической бронхиальной астмы с контролируемым и неконтролируемым течением // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 605-614. [Smolnikova M.V., Freidin M.B., Smirnova S.V. Cytokine genes as genetic markers of controlled and uncontrolled atopic bronchial asthma. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 605-614. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-605-614.

11. Смольникова М.В., Смирнова С.В., Ильенкова Н.А., Коноплева О.С. Иммунологические маркеры неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 453-460. [Smolnikova M.V., Smirnova S.V., Ilyenkova N.A., Konopleva O.S. Immunological markers of uncontrolled atopic bronchial asthma in children. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 453-460. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-453-460.

12. Смольникова М.В., Смирнова С.В., Коноплева О.С. Цитокины и полиморфизм промоторных регионов генов (C-590T IL4 and C-597C IL10) как маркеры неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей // Сибирский научный медицинский журнал, 2015. Т. 35, № 3. С. 4-9. [Smolnikova M.V., Smirnova S.V., Konopleva O.S. Cytokines and genes polymorphism in the promoter regions (C-590T IL4 and C-597C IL10) as markers of uncontrolled atopic bronchial asthma in children. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*, 2015, Vol. 35, no. 3, pp. 4-9. (In Russ.)]

13. Berdeli A., Celik H.A., Özyürek R., Dogrusoz B., Aydin H.H. TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with acute rheumatic fever in children. *J. Mol. Med.*, 2005, Vol. 83, pp. 535-541.

14. Chung K.F., Bel E.H., Wenzel S.E. AIRE-asthma insights and realities in Europe. *European Respiratory Society Monograph*, 2011, Vol. 51, 310 p.

15. Global initiative for Asthma. Global strategy for Asthma Management and Prevention 2020. Available at: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report_-final_-wms.pdf.

16. Hu L., Tao H., Tao X., Tang X., Xu C. TLR2 Arg753Gln gene polymorphism associated with tuberculosis susceptibility: an updated meta-analysis. *BioMed Res. Int.*, 2019, Vol. 2019, 2628101. doi: 10.1155/2019/2628101.

17. Lu K.C., Yang H.Y., Lin Y.F., Kao S.Y., Lai C.H., Chu C.M., Wu C.C., Sune S.L. The T-1237C polymorphism of the Toll-like receptor-9 gene is associated with chronic kidney disease in a han chinese population. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 225, no. 2, pp. 109-116.

18. Mockenhaupt F.P., Cramer J.P., Hamann L., Stegemann M.S., Eckert J., Oh N.R., Otchwemah R.N., Dietz E., Ehrhardt S., Schröder N.W.J., Bienzle U., an Schumann R.R. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 1, pp. 177-182.

19. NHWS-National Health and Wellness Survey. Available at: <https://www.kantarhealth.com/docs/datasheets/kh-national-health-and-wellness-survey.pdf>.

20. Pabst S., Yenice V., Lennarz M., Tuleta I., Nickenig G., Gillissen A., Grohé C. Toll-like receptor 2 gene polymorphisms Arg677Trp and Arg753Gln in chronic obstructive pulmonary disease. *Lung*, 2009, Vol. 187, no. 3, pp. 173-178.

21. Panda A.K., Pattanaik S.S., Tripathy R., Das B.K. TLR-9 promoter polymorphisms (T-1237C and T-1486C) are not associated with systemic lupus erythematosus: a case control study and meta-analysis. *Hum Immunol.*, 2013, Vol. 74, no. 12, pp. 1672-1678.
22. Prescott S.L. Allergy takes its toll: the role of Toll-like receptors in allergy pathogenesis. *World Allergy Organ J.*, 2008, Vol. 1, no. 1, pp. 4-8.
23. Steiner M., Hawranek T., Schneider M., Ferreira F., Horejs-Hoeck J., Harrer A., Himly M. Elevated Toll-like receptor-induced CXCL8 secretion in human blood basophils from allergic donors is independent of Toll-Like receptor expression levels. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 2, e0149275. doi: 10.1371/journal.pone.0149275.
24. Zakeri A., Russo M. Dual role of Toll-like receptors in human and experimental asthma models. *Front Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1027. doi: 10.3389/fimmu.2018.01027.

Авторы:

Супрун Е.Н. — к.м.н., старший научный сотрудник группы медико-экологических проблем здоровья матери и ребенка лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; врач аллерголог-иммунолог; доцент кафедры госпитальной и факультетской педиатрии с курсом пропедевтики детских болезней, ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет», г. Хабаровск, Россия

Наговицына Е.Б. — к.м.н., старший научный сотрудник группы молекулярно-генетической диагностики лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Хабаровск, Россия

Кудерова Н.И. — научный сотрудник группы клинической иммунологии и эндокринологии лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Хабаровск, Россия

Супрун С.В. — д.м.н., главный научный сотрудник группы медико-экологических проблем здоровья матери и ребенка лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Хабаровск, Россия

Лебедько О.А. — д.м.н., заведующая лабораторией комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии, директор, Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Хабаровск, Россия

Authors:

Suprun E.N., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Group of Health and Environmental Problems of Mother and Child Health, Laboratory of Integral Methods of Bronchopulmonary and Perinatal Pathology Research, Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch, Far Eastern Scientific Center for Physiology and Respiratory Pathology; Allergist-Immunologist; Associate Professor, Department of Hospital and Faculty Pediatrics with a Course of Propaedeutics of Children's Diseases, Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Nagovitsyna E.B., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Molecular Genetic Diagnosis Group, Laboratory of Integral Methods of Bronchopulmonary and Perinatal Pathology Research, Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch, Far Eastern Scientific Center for Physiology and Respiratory Pathology, Khabarovsk, Russian Federation

Kuderova N.I., Research Associate, Group of Clinical Immunology and Endocrinology, Laboratory of Integral Methods of Bronchopulmonary and Perinatal Pathology Research, Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch, Far Eastern Scientific Center for Physiology and Respiratory Pathology, Khabarovsk, Russian Federation

Suprun S.V., PhD, MD (Medicine), Main Research Associate, Group of Health and Environmental Problems of Mother and Child Health, Laboratory of Integral Methods of Bronchopulmonary and Perinatal Pathology Research, Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch, Far Eastern Scientific Center for Physiology and Respiratory Pathology, Khabarovsk, Russian Federation

Lebed'ko O.A., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Integral Methods of Bronchopulmonary and Perinatal Pathology Research, Director, Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch, Far Eastern Scientific Center for Physiology and Respiratory Pathology, Khabarovsk, Russian Federation

Поступила 05.05.2020
Отправлена на доработку 06.05.2020
Принята к печати 08.05.2020

Received 05.05.2020
Revision received 06.05.2020
Accepted 08.05.2020

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ПСОРИАЗУ И ПСОРИАТИЧЕСКОМУ АРТРИТУ

Смольникова М.В., Барило А.А., Малинчик М.А., Смирнова С.В.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Резюме. Псориаз (ПС) и псориатический артрит (ПсА) – взаимосвязанные заболевания, сочетающиеся приблизительно у 30% больных и характеризующиеся наличием системной воспалительной реакции, возникающей вследствие нарушения функционального состояния иммунной системы. С появлением новых технологий охарактеризовано несколько новых провоспалительных цитокинов, таких как IL-23, IL-31 и IL-33, играющих важную роль в патогенезе псориатического процесса. Определено, что однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) в промоторных областях генов *IL23*, *IL31* и *IL33* играют важную роль в контроле экспрессии соответствующих цитокинов, задействованных в иммунопатогенезе псориатической болезни. Цель исследования – проанализировать частоту генотипов и аллельных вариантов полиморфизмов *IL23A* (rs2066808), *IL23R* (rs2201841), *IL31* (rs7977932) и *IL33* (rs7044343), с целью поиска генетических маркеров предрасположенности к псориазу и псориатическому артриту. Проведено генотипирование больных псориазом (ПС, n = 77), медиана возраста 31,0 год (27,0-43,0), псориатическим артритом (ПсА, n = 99), медиана возраста 49,0 лет (39,0-56,0) и практически здоровых жителей г. Красноярска (n = 103), медиана возраста 32,0 года (24,0-38,0). Выделение ДНК из цельной венозной крови проводилось при помощи стандартного набора с сорбентом. Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов *IL23A* (rs2066808), *IL23R* (rs2201841), *IL31* (rs7977932), *IL33* (rs7044343) осуществлено при помощи метода ПЦР в режиме реального времени с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов. Полученные в ходе исследования частоты аллельных вариантов изученных генов цитокинов в контрольной группе соответствуют их распределению в европеоидных популяциях – преобладают аллели *IL23A*Т*, *IL23R*Т*, *IL31*С*, *IL33*С*. При сравнении частоты распределения аллельных вариантов генов *IL23A*, *IL23R*, *IL31*, *IL33* нами не получено статистически значимых различий между больными и группой контроля. Несмотря на то, что при сравнении частоты распределения аллельных вариантов генов *IL23A*, *IL23R*, *IL31*, *IL33* нами не получено статистически значимых различий между больными и группой контроля, есть результаты, достойные внимания. Так, у больных ПС частота аллельного варианта *С* IL23A* (rs2066808) ниже, чем в популяционной выборке, что может говорить о его определенной роли в отношении развития заболевания. Все это диктует необходимость продолжения исследований с оценкой других ОНП и увеличение выборки больных в поиске потенциальных генетических маркеров псориатической болезни.

Ключевые слова: псориаз, псориатический артрит, цитокины, *IL23*, *IL31*, *IL33*, полиморфизм генов

Адрес для переписки:

Смольникова Марина Викторовна
Научно-исследовательский институт медицинских
проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел./факс: 8 (391) 228-06-83.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Address for correspondence:

Smolnikova Marina V.
Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zheleznyak str., 3g.
Phone/fax: 7 (391) 228-06-83.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Образец цитирования:

М.В. Смольникова, А.А. Барило, М.А. Малинчик,
С.В. Смирнова «Поиск генетических маркеров
предрасположенности к псориазу и псориатическому
артриту» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22,
№ 5. С. 925-932. doi: 10.15789/1563-0625-SFG-2050

© Смольникова М.В. и соавт., 2020

For citation:

M.V. Smolnikova, A.A. Barilo, M.A. Malinchik,
S.V. Smirnova "Search for genetic markers of predisposition
to psoriasis and psoriatic arthritis", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 5,
pp. 925-932. doi: 10.15789/1563-0625-SFG-2050

DOI: 10.15789/1563-0625-SFG-2050

SEARCH FOR GENETIC MARKERS OF PREDISPOSITION TO PSORIASIS AND PSORIATIC ARTHRITIS

Smolnikova M.V., Barilo A.A., Malinchik M.A., Smirnova S.V.

Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Psoriasis (PS) and psoriatic arthritis (PsA) are interrelated diseases that occur in approximately 30% of patients and are characterized by the presence of a systemic inflammatory reaction that occurs as a result of a violation of the functional state of the immune system. With the advent of new technologies, several new pro-inflammatory cytokines, such as IL-23, IL-31, and IL-33, which play an important role in the pathogenesis of the psoriatic process, have been discovered and characterized. It was determined that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter regions of the *IL23*, *IL31* and *IL33* genes play an important role in controlling the expression of relevant cytokines involved in the immunopathogenesis of psoriatic disease. The purpose of the study: to analyze the distribution of genotypes and allelic variants of polymorphisms of the *IL23A* (rs2066808), *IL23R* (rs2201841), *IL31* (rs7977932) and *IL33* (rs7044343), in order to search for genetic markers of predisposition to psoriasis and psoriatic arthritis. Materials and methods. The genotyping of the patients was conducted: psoriasis (PS, n = 77), median age 31.0 years (27.0–43.0), psoriatic arthritis (PsA, n = 99), median age 49.0 years (39.0–56.0) and practically healthy residents of Krasnoyarsk (n = 103), a median age of 32.0 years (24.0–38.0). DNA was isolated from whole venous blood using a standard sorbent kit. Genotyping of single nucleotide polymorphisms *IL23A* (rs2066808), *IL23R* (rs2201841), *IL31* (rs7977932), *IL33* (rs7044343) was carried out using real-time PCR using specific oligonucleotide primers and fluorescently-labeled probes. Results and discussion. The frequencies of allelic variants of the studied cytokine genes in the control group obtained during the study correspond to their distribution in Caucasoid populations – the alleles *IL23A* * T, *IL23R* * T, *IL31* * C, *IL33* * C prevail. When comparing the distribution frequency of allelic variants of the *IL23A*, *IL23R*, *IL31*, *IL33* genes, we did not obtain statistically significant differences between patients and the control group. Conclusions. Despite the fact that when comparing the distribution frequency of allelic variants of the *IL23A*, *IL23R*, *IL31*, *IL33* genes, we did not obtain statistically significant differences between the patients and the control group, there are results worthy of attention. So, in patients with PS, the frequency of the C * *IL23A* allelic variant (rs2066808) is lower than in the population sample, which may indicate its specific role in relation to the development of the disease. All this dictates the need to continue research with the assessment of other SNPs and increase the sample of patients in search of potential genetic markers of psoriatic disease.

Keywords: psoriatic arthritis, cytokines, *IL23*, *IL31*, *IL33*, gene polymorphism

Введение

Псориаз (ПС) является хроническим, пролиферативным и воспалительным заболеванием кожи, характеризующимся наличием типичных бляшек с серебристыми чешуйками на поверхности [1]. Псориатический артрит (ПсА) – разновидность хронического воспалительного артрита с поражением как периферических суставов, так и осевого скелета [15]. Псориаз и псориатический артрит – взаимосвязанные заболевания, сочетающиеся приблизительно у 30% больных [1] и характеризующиеся наличием системной воспалительной реакции, возникающей вследствие нарушения функционального состояния иммунной системы [15]. В развитии системного воспаления важную роль играет дисбаланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [2, 13]. С появлением высоких технологий охарактери-

зовано несколько новых провоспалительных цитокинов, таких как IL-23, IL-31 и IL-33, играющих важную роль в патогенезе псориатического процесса. Есть данные о повышении концентрации данных провоспалительных цитокинов как в очагах псориатического поражения кожи, так и в суставной жидкости больных псориатическим артритом [12, 15].

В патогенезе ПС и ПсА ведущая роль отводится Th17 подтипу Т-хелперных клеток. IL-23 синтезируется главным образом макрофагами и дендритными клетками и играет ключевую роль в дифференцировке Th1- и Th17-лимфоцитов [4]. Активированные Th1-лимфоциты секретируют интерферон- γ (IFN γ) и фактор некроза опухоли- α (TNF α), тогда как Th17-лимфоциты продуцируют IL-17, IL-22 и IL-23. Эти провоспалительные цитокины индуцируют пролиферацию ке-

рагиноцитов и дополнительно поддерживают воспаление кожи, приводящее к образованию псориатических бляшек. Псориатические бляшки содержат как дендритные клетки, так и Th17-лимфоциты, продуцирующие IL-23 и экспрессирующие рецептор IL-23 [14]. IL-23 играет ключевую роль в развитии воспаления в периферических тканях, являясь мощным стимулом, ведущим к продукции IL-17 [4]. Важная роль IL-23 в патогенезе псориаза была дополнительно подтверждена результатами исследований о положительном эффекте цитокинотерапии в лечении псориаза [14]. IL-23 принадлежит к небольшой группе гетеродимерных цитокинов, имеющих общую субъединицу p40 [7]. Терапия моноклональными антителами, содержащими субъединицы p40 и p19, продемонстрировала высокую клиническую эффективность у больных псориазом [14]. Данные о концентрации IL-23 в сыворотке крови больных ПС противоречивы. Есть сведения, что концентрация IL-23 статистически значимо выше в сыворотке и очагах поражения кожи больных ПС в сравнении с контролем [4]. В других исследованиях было продемонстрировано, что концентрация IL-23 в сыворотке крови больных ПС была значительно ниже в сравнении с контрольной группой [7].

В геномных исследованиях выявлено несколько генов, кодирующих обе субъединицы цитокина IL-23 (IL12Bp40 и IL23Ap19), а также рецептор IL-23 (IL23R), ассоциированных с псориазом [5]. Ген *IL23A* расположен на хромосоме 12q13.2 и состоит из четырех экзонов и трех интронов. Доказана роль однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) *IL23A* в промоторном регионе гена, в развитии ПсА. Так, отмечена ассоциация полиморфизма rs2066808 гена *IL23A* с ПсА. В исследованиях популяции европеоидов определено, что среди больных ПсА статистически значимо чаще встречались носители А-аллеля гена *IL23A* rs2066808 [5]. Однако существуют исследования, в которых показано, что носители гаплотипа АС полиморфизма rs2066808 имели сниженный риск развития ПсА [12].

Рецептор IL-23 (IL-23R) представляет собой гетеродимерный рецептор, состоящий из IL-12RB1 и IL-23R. Рецептор IL-23 экспрессируется на Т-клетках (преимущественно Th17-лимфоцитах), натуральных киллерах (НК-клетках), моноцитах и дендритных клетках [5]. Ген *IL23R* локализован в хромосоме 1p31.3, состоит из 11 экзонов и 10 интронов и имеет длину 2912 п.н. Полиморфизм rs2201841 находится в 7-м интроне. Существует много исследований, оценивающих ассоциацию ПС и полиморфизма rs2201841 гена *IL23R*, однако данные противоречивы. В метаанализе определено, что G-аллель

rs2201841 (A>G) и генотип GG ассоциированы с ПС [15]. Данные с обратной комплементарной цепи ДНК (-) показывают, что альтернативные генотипы CT и CC в локусе rs2201841 (T>C) статистически значимо встречаются чаще в группе больных ПС в сравнении с контролем, однако генотип CC был ассоциирован с высокой концентрацией IL-23 в сыворотке крови [8]. Определено, что генотип AA локуса rs2201841 (A>G) у мужчин и генотип GA у женщин встречались статистически значимо чаще у больных ПС [7]. В других исследованиях, напротив, не было обнаружено существенных различий в носительстве генотипов AA, GA и GG в локусе rs2201841 у больных ПС и в контрольной группе [5, 7].

Интерлейкин 31 (IL-31) был впервые описан в 2004 году как член семейства гликопротеина 130/IL-6. IL-31 синтезируется активированными Th2-лимфоцитами, тучными клетками, макрофагами, ганглиями дорсальных корешков, кератиноцитами, эозинофилами. В исследованиях на животных определена повышенная концентрация IL-31 при тяжелом кожном зуде, алопеции, различных поражениях кожи [10]. Следовательно, в патогенезе псориаза IL-31 представляет особый интерес в качестве триггера кожного зуда и воспаления, а также нарушения барьерной функции кожи, возникающей в результате ремоделирования ткани [10]. Первоначально считалось, что IL-31 не играет ключевой роли при псориазе, основываясь на сравнении уровня экспрессии данного цитокина у больных в сравнении с контролем. Однако появились данные о повышенной концентрации IL-31 в сыворотке крови больных ПС, причем предполагается, что хронический зуд, связанный с очагами псориатического поражения кожи, сопровождается повышенной экспрессией IL-31 [10]. В проведенных исследованиях выявлено, что тучные клетки кожи в псориатических очагах экспрессируют повышенный уровень IL-31 в сравнении с контролем [11]. В других исследованиях, напротив, не наблюдалось какой-либо корреляции между тяжестью кожного зуда при псориазе и концентрацией IL-31 [4]. Таким образом, несмотря на то, что IL-31 может принимать участие в патогенезе зудящих форм патологии, данные о его роли при псориазе остаются противоречивыми.

Ген, кодирующий IL-31, расположен на хромосоме 12q24.31. Отмечена ассоциация некоторых полиморфизмов гена *IL31* с развитием аутоиммунных и аллергических заболеваний [9]. Так, в тайваньской популяции выявлена ассоциация G-аллеля полиморфизма rs7977932 гена *IL31* с развитием атопической экземы (OR = 18,25, 95% CI = 3,27-101,94; p = 0,0009) [9].

Интерлейкин 33 (IL-33) является цитокином семейства IL-1, которое включает в себя IL-1 и IL-18. IL-33 принимает активное участие в иммунных реакциях, физиологических и патологических процессах, таких как поддержание гомеостаза тканей и развитие аутоиммунных заболеваний. IL-33 является веществом, с одной стороны, выполняющим функцию алармина, а с другой – классическим цитокином Th2 профиля. IL-33 секретируется макрофагами, дендритными клетками, фибробластами, остеобластами и рядом других клеток [6]. IL-33 может активировать Th2-клетки и базофилы, способствуя выработке ими провоспалительных цитокинов. Отмечено, что нарушения в структуре эпидермального барьера и постоянная механическая микротравма могут привести к некрозу клеток, что, по видимому, способствует высвобождению IL-33 и возникновению псориазического воспаления. Кроме того, IL-33 играет определенную роль в развитии воспаления суставов в результате активации Th1/Th17-лимфоцитов. IL-33 был идентифицирован в синовиальных клетках пораженных суставов у больных ревматоидным артритом, что связывают с продукцией аутоантител и эрозивным изменением костной ткани [13]. Провоспалительный IL-33 усиливает выработку предшественников остеокластов при воспалительных заболеваниях суставов [6].

Ген *IL33* расположен на хромосоме 9 (9p24.1) [6]. Была выявлена ассоциация полиморфизмов гена *IL33* и аутоиммунными заболеваниями [6]. В литературе есть указания на то, что полиморфизмы гена *IL33*, возможно, ассоциированы с воспалением кожи и, как следствие, с развитием псориазической болезни [6].

Таким образом, определено, что однонуклеотидные полиморфизмы в промоторных областях генов *IL23*, *IL31* и *IL33* играют важную роль в контроле экспрессии цитокинов IL-23, IL-31, IL-33, задействованных в иммунопатогенезе псориазической болезни. Необходимы дополнительные исследования, чтобы найти генетически детерминированную основу псориазической болезни.

Цель настоящего исследования – изучить распределение частоты генотипов полиморфизмов *IL23A* (rs2066808), *IL23R* (rs2201841), *IL31* (rs7977932) и *IL33* (rs7044343), определить возможные генетические маркеры предрасположенности к псориазу и псориазическому артриту.

Материалы и методы

Для проведения молекулярно-генетического анализа обследованы больные псориазической болезнью (n = 176): псориазом (ПС, n = 77, мужчины – 54, женщины – 23), медиана возраста

31,0 год (27,0–43,0) и псориазическим артритом (ПсА, n = 99, мужчины – 39, женщины – 60), медиана возраста 49,0 лет (39,0–56,0). В качестве группы контроля исследованы практически здоровые жители г. Красноярска (n = 103, мужчины – 56, женщины – 47), медиана возраста 32,0 года (24,0–38,0). Все больные обследованы в прогрессирующую стадию кожного процесса до начала проведения терапии. Тяжесть клинических проявлений псориаза оценивалась по индексу PASI (Psoriasis Area and Severity Index). Критерии включения больных в исследование: наличие клинически подтвержденного диагноза псориаза/псориазического артрита в прогрессирующей стадии, европеоидное происхождение (3 поколения), возраст от 18 до 70 лет. Критерии включения в контрольную группу: отсутствие системных и хронических заболеваний, европеоидное происхождение (3 поколения), возраст 20–40 лет.

Протокол обследования больных и практически здоровых людей отвечал этическим нормам и был разрешен комитетом биомедицинской этики ФИЦ КИЦ СО РАН. Получено письменное информированное согласие на проведение исследования от всех участников. Тип исследования – «случай-контроль».

Материалом исследования послужила ДНК, выделенная из периферической крови с использованием набора DIALom DNAPrep100 (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов *IL23A* (rs2066808), *IL23R* (rs2201841), *IL31* (rs7977932), *IL33* (rs7044343) осуществлено при помощи метода ПЦР в режиме реального времени с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченных зондов (TagMan) (ООО «ДНК-синтез», Россия) по протоколу производителя.

Частота встречаемости качественных признаков выражена в абсолютных и относительных значениях. Статистически значимыми считались различия на уровне значимости $p < 0,05$. Распределение генотипов по полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга (ХВ) с помощью критерия χ^2 и точного теста Фишера. Расчет отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (CI) проводилось для ассоциации генетических маркеров с фенотипами патологии.

Результаты и обсуждение

Изученные в работе полиморфизмы *IL23A* (rs2066808), *IL23R* (rs2201841), *IL31* (rs7977932), *IL33* (rs7044343) представляют огромный интерес для поисковых исследований маркеров патологии, поскольку продукты этих генов играют важную роль в иммунопатогенезе воспаления при аутоиммунных заболеваниях, в частности

при псориатической болезни (Popadic et al., 2014; Sehat et al., 2018).

Сравнения частот аллелей и генотипов проводилось как между общей группой больных псориатической болезнью и контролем, так и между

больными, выделенными с учетом тяжести заболевания (ПС и ПсА) и контрольной выборкой (табл. 1).

Полученные в ходе исследования частоты аллельных вариантов изученных генов цитоки-

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ИЗУЧЕННЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ И ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ, % (n)

TABLE 1. FREQUENCIES OF GENOTYPES AND ALLELES OF THE STUDIED GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH PSORIASIS AND PSORIATIC ARTHRITIS, % (n)

Генотип Genotype	Группы Groups				OR (95% ДИ) OR (95% CI)	p
	ПС + ПсА PS+PsA (1) n = 176	ПС PS (2) n = 77	ПсА PsA (3) n = 99	Контроль Control (4) n = 103		
<i>IL23A</i> (rs2066808)						
ТТ	90,9 (160)	92,2 (71)	89,9 (89)	86,4 (89)	1,4 = 0,74 (0,36-1,52) 2,4 = 0,56 (0,21-1,48) 3,4 = 0,89 (0,39-1,96)	p _{1,4} = 0,41 p _{2,4} = 0,24 p _{3,4} = 0,76
ТС	8,0 (14)	7,8 (6)	8,1 (8)	13,6 (14)		
СС	1,1 (2)	0 (0)	2,0 (2)	0 (0)		
С*	5,1	3,9	6,1	6,8		
<i>IL23R</i> (rs2201841)						
ТТ	47,7 (84)	45,4 (35)	49,5 (49)	53,4 (55)	1,4 = 1,11 (0,76-1,61) 2,4 = 1,14 (0,73-1,79) 3,4 = 1,1 (0,71-1,66)	p _{1,4} = 0,59 p _{2,4} = 0,56 p _{3,4} = 0,71
ТС	40,9 (72)	44,2 (34)	38,4 (38)	34,0 (35)		
СС	11,4 (20)	10,4 (8)	12,1 (12)	12,6 (13)		
С*	31,9	32,5	31,3	29,6		
<i>IL31</i> (rs7977932)						
СС	60,2 (106)	59,7 (46)	60,6 (60)	64,1 (66)	1,4 = 0,94 (0,62-1,42) 2,4 = 0,98 (0,60-1,61) 3,4 = 0,91 (0,60-1,46)	p _{1,4} = 0,77 p _{2,4} = 0,93 p _{3,4} = 0,69
СG	35,8 (63)	35,1 (27)	36,4 (36)	26,2 (27)		
GG	4,0 (7)	5,2 (4)	3,0 (3)	9,7 (10)		
G*	21,9	22,75	21,2	22,8		
<i>IL33</i> (rs7044343)						
ТТ	32,9 (58)	39 (30)	28,3 (28)	31,1 (32)	1,4 = 1,02 (0,72-1,44) 2,4 = 1,26 (0,82-1,95) 3,4 = 0,86 (0,60-1,28)	p _{1,4} = 0,94 p _{2,4} = 0,29 p _{3,4} = 0,46
ТС	52,3 (92)	50,6 (39)	53,5 (53)	55,3 (57)		
СС	14,8 (26)	10,4 (8)	18,2 (18)	13,6 (14)		
Т*	40,9	35,7	44,9	41,2		

нов в популяционной выборке соответствуют их распределению в европеоидных популяциях — преобладают аллели *IL23A*Т*, *IL23R*Т*, *IL31*С*, *IL33*С* (согласно ресурсу www.ensembl.org).

При сравнении частоты распределения аллельных вариантов генов *IL23A*, *IL23R*, *IL31*, *IL33* нами не получено статистически значимых различий между общей группой больных псориазической болезнью, псориазом, псориазическим артритом и группой контроля.

Интерлейкин 23 (IL-23) является цитокином, координирующим активность иммунных клеток и играющим ключевую роль в патогенезе иммунных воспалительных заболеваний [14]. Отмечено, что полиморфизмы в гене рецептора (*IL23R*) могут влиять на уровень экспрессии IL-23. Данные по распределению генотипов некоторых ОНП *IL23* имеют разную картину в популяциях мира. Например, функциональный ОНП rs11209026 в гене рецептора ассоциирован с защитой от развития ревматоидного артрита и псориаза, поэтому предполагается, что пертурбация в пути передачи сигналов IL-23 имеет отношение к их патофизиологии [3]. Кроме этого, известно, что генотипы *CT* и *CC* в локусе *IL23R* rs2201841 статистически значимо чаще встречаются в группе больных псориазом в сравнении с контролем, а генотип *CC* был ассоциирован с высокой концентрацией IL-23 в сыворотке крови больных [8]. В нашем исследовании у больных ПС частота аллельного варианта *C** *IL23A* (rs2066808) ниже, чем в популяционной выборке. Возможно, изучение других функциональных полиморфизмов генов *IL23*, например, rs11209026, даст результаты о потенциальных генетических маркерах псориазической болезни и тяжести ее течения. IL-31 и IL-33 воздействуют на широкий спектр клеток,

обладая потенциальными плеiotропными физиологическими функциями, включающими регуляцию кроветворения и иммунного ответа, вызывая развитие системного воспаления. Показано, что IL-33 играет важную роль в развитии воспаления суставов в результате активации Th1/Th17-лимфоцитов, с последующей продукцией аутоантител и эрозивными изменениями костной ткани [13]. Однако данные об ассоциации полиморфизмов генов *IL31* и *IL33* с риском развития псориаза и псориазического артрита крайне немногочисленны.

Заключение

Несмотря на то, что при сравнении частоты распределения аллельных вариантов генов *IL23A*, *IL23R*, *IL31*, *IL33* нами не получено статистически значимых различий между больными ПС, ПсА и группой контроля, есть результаты, достойные внимания. В нашем исследовании у больных ПС частота аллельного варианта *C** *IL23A* (rs2066808) ниже, чем в популяционной выборке, что может говорить об его определенной роли в отношении развития заболевания. Кроме того, гены, кодирующие IL-31 и IL-33, могут быть важными генами-кандидатами для изучения предрасположенности к псориазической болезни, как классической аутоиммунной патологии. Все это диктует необходимость продолжения исследований. Оценка функциональной роли других ОНП имеет большое значение для понимания их роли в иммунопатогенезе псориазического воспаления. Увеличение выборки больных псориазом и псориазическим артритом позволит получить более значимые результаты в поиске потенциальных генетических маркеров заболевания.

Список литературы / References

1. Барило А.А., Смольникова М.В., Смирнова С.В. Частота распределения генотипов полиморфизма IL4 (rs 2243250) при псориазе и псориазическом артрите // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2019. Т. 23, № 1. С. 75-80. [Barilo A.A., Smolnikova M.V., Smirnova S.V. The frequency of distribution of the genotypes of the IL4 polymorphism (rs 2243250) in psoriasis and psoriatic arthritis. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2019, Vol. 23, no. 1, pp. 75-80. (In Russ.)]
2. Барило А.А., Смирнова С.В., Смольникова М.В. Показатели иммунитета у больных псориазическим артритом в зависимости от возраста // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 69-76. [Barilo A.A., Smirnova S.V., Smolnikova M.V. Age-dependent indexes of immunity in the patients with psoriatic arthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 69-76. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-69-76.
3. Abdollahi E., Tavasolian F., Momtazi-Borojeni A.A., Samadi M., Rafatpanah H. Protective role of R381Q (rs11209026) polymorphism in IL-23R gene in immune-mediated diseases: A comprehensive review. *J. Immunotoxicol.*, 2016, Vol. 13, no. 3, pp. 286-300.
4. Czarnecka-Operacz M., Polanska A., Klimanska M., Teresiak-Mikołajczak E., Molinska-Glura M., Adamski Z., Jenerowicz D. Itching sensation in psoriatic patients and its relation to body mass index and IL-17 and IL-31 concentrations. *Postepy Dermatol. Alergol.*, Vol. 2015, no. 32, pp. 426-430.

5. Eiris N., González-Lara L., Santos-Juanes J., Queiro R., Coto E., Coto-Segura P. Genetic variation at IL12B, IL23R and IL23A is associated with psoriasis severity, psoriatic arthritis and type 2 diabetes mellitus. *J. Dermatol. Sci.*, 2014, Vol. 75, no. 3, pp.167-172.
6. Fan D., Ding N., Yang T., Wu S., Liu S., Liu L., Hu Y., Duan Z., Xia G., Xu S., Xu J., Ding C., Pan F. Single nucleotide polymorphisms of the interleukin-33 (IL-33) gene are associated with ankylosing spondylitis in Chinese individuals: a case-control pilot study. *Scand. J. Rheumatol.*, 2014, Vol. 43, no. 5, pp. 374-379.
7. Filiz B., Yildirim M., Öztürk K.H., Şirin F.B., Çelik S., Erturan İ., Korkmaz S., Orhan H. Evaluation of interleukin-23 receptor (IL-23R) gene polymorphisms and serum IL-23 levels in patients with psoriasis. *Turk. J. Med. Sci.*, 2019, Vol. 49, no. 5, pp. 1386-1394.
8. Indhumathi S., Rajappa M., Chandrashekar L., Ananthanarayanan P.H., Thappa D.M., Negi V.S. al. Investigation of association of the IL12B and IL-23R genetic variations with psoriatic risk in a South Indian Tamil cohort. *Hum. Immunol.*, 2016, Vol. 77, pp. 54-62.
9. Lan C.C., Tu H.P., Wu C.S., Ko Y.C., Yu H.S., Lu Y.W., Li W.C., Chen Y.C., Chen G.S. Distinct Spink5 and Il-31 polymorphisms are associated with atopic eczema and non-atopic hand dermatitis in Taiwanese nursing population. *Exp. Dermatol.*, 2011, Vol. 20, no. 12, pp. 975-979.
10. Nattkemper L.A., Tey H.L., Valdes-Rodriguez R., Lee H., Mollanazar N.K., Albornoz C., Sanders K.M., Yosipovitch G. The genetics of chronic itch: gene expression in the skin of patients with atopic dermatitis and psoriasis with severe itch. *J. Invest. Dermatol.*, 2018, Vol. 138, pp. 1311-1317.
11. Niyonsaba F., Ushio H., Hara M., Yokoi H., Tominaga M., Takamori K., Kajiwarana N., Saito H., Nagaoka I., Ogawa H., Okumura K. Antimicrobial peptides human beta-defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, pp. 3526-3534.
12. Popa O.M., Kriegova E., Popa L., Schneiderova P., Dutescu M.I., Bojinca M., Bara C., Petrek M. Association study in Romanians confirms IL23A gene haplotype block rs2066808/rs11171806 as conferring risk to psoriatic arthritis. *Cytokine*, 2013, Vol. 63, no. 1, pp. 67-73.
13. Sehat M., Talaei R., Dadgostar E., Nikoueinejad H., Akbari H. Iran evaluating serum levels of IL-33, IL-36, IL-37 and gene expression of il-37 in patients with psoriasis vulgaris. *J. Allergy Asthma Immunol.*, 2018, Vol. 17, no. 2, pp. 179-187.
14. Sofen H., Smith S., Matheson R.T., Leonardi C.L., Calderon C., Brodmerkel C., Li K., Campbell K., Marciniak S.J., Wasfi Y., Wang Y., Szapary P., Krueger J.G. Guselkumab (an IL-23-specific mAb) demonstrates clinical and molecular response in patients with moderate-to-severe psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 133, no. 4, pp. 1032-1040.
15. Zhu K.J., Zhu C.Y., Shi G., Fan Y.M. Association of IL23R polymorphisms with psoriasis and psoriatic arthritis: a metaanalysis. *Inflamm. Res.*, 2012, Vol. 61, pp. 1149-1154.

Авторы:

Смольникова М.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Барило А.А. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Authors:

Smolnikova M.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Barilo A.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Малинчик М.А. — аспирант, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Смирнова С.В. — д.м.н., профессор, руководитель научного направления, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Malinchik M.A., Postgraduate Student, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Smirnova S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Scientific Direction, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 06.05.2020
Отправлена на доработку 07.05.2020
Принята к печати 08.05.2020

Received 06.05.2020
Revision received 07.05.2020
Accepted 08.05.2020

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЬНЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ ФЕНОТИПОМ ОСТЕОАРТРИТА: ПОИСКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Ширинский В.С., Калиновская Н.Ю., Филатова Е.Ю.,
Ширинский И.В.

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

Резюме. Терапия остеоартрита (ОА) у больных с коморбидностью представляет значительные трудности из-за побочных эффектов и недостаточной эффективности современных препаратов. Безопасной и эффективной альтернативой могут быть методы традиционной медицины и их комбинированное применение. Цель – оценить эффективность и безопасность комбинации парафармацевтика на основе куркумы в сочетании с акупунктурой при метаболическом фенотипе ОА (МФОА). Дизайн исследования – пилотное открытое исследование «до – после» продолжительностью 12 недель. Пациенты с МФОА принимали парафармацевтик «Эпигенорм антивир» в суточной дозе 1000 мг в сочетании с классической акупунктурой (15–20 сеансов).

Обследованы 23 женщины с метаболическим синдромом (МС), клиническими и рентгенологическими признаками гонартроза, средний возраст 66,5 лет, средний индекс массы тела 34,5. В конце наблюдения у больных выявлено снижение уровня боли по визуальной аналоговой шкале (ВАШ) (до – 65 (12,7) после – 24,6 (21,0), $p = 0,001$), WOMAC (до – 210,6 (102,2), после – 103 (80,8), $p = 0,014$), KOOS (до – 47,8 (12,1), после – 66,7 (16,2), $p = 0,001$). Лечение статистически значимо улучшало показатели повседневной и социальной активности (KOOS), ролевых функций, показатели качества жизни. Результаты лечения были клинически значимы, поскольку размер эффекта по большинству конечных точек в соответствии с классификацией Cohen был умеренным (Cohen $d > 0,5$) или высоким (Cohen $d > 0,8$). Клиническое улучшение ассоциировалось со снижением содержания компонентов МС – холестерина ЛПНП (до – 3,26 (0,26) ммоль/л, после – 2,43 (0,2) ммоль/л, $p = 0,001$), триглицеридов (до – 2,02 (0,16) ммоль/л, после – 1,31 (0,1) ммоль/л, $p = 0,005$). Терапия вызывала уменьшение уровня системного воспаления за счет снижения концентрации TNF α (до – 15,9 (1,2) пг/мл, после – 12,4 (0,8) пг/мл, $p = 0,002$), гистамина (до – 1,6 (0,2) нг/мл, после – 0,7 (0,2) нг/мл, $p = 0,034$), IL-18 (до – 208,8 (32,6) пг/мл, после – 160,0 (26,0) пг/мл, $p = 0,002$) и СРБ (до – 6,05 (1,3) мг/л, после – 3,2 (0,7) мг/л, $p = 0,022$). В то же время увеличивалось содержание IL-10 (до – 1,5 (0,7) пг/мл, после – 3,8 (1,2) пг/мл, $p = 0,006$) и адипонектина (до – 34,0 (5,6) нг/мл, после – 40,0 (6,9) нг/мл, $p = 0,034$). Терапия хорошо переносилась пациентами, серьезных нежелательных событий зарегистрировано не было.

Многоцелевое действие комбинированного лечения, видимо, обусловлено синергическим эффектом взаимодействия лекарственных трав и акупунктуры. Результаты дают основания для проведения более масштабных, контролируемых, слепых, рандомизированных клинических испытаний.

Ключевые слова: остеоартрит, метаболический синдром, «Эпигенорм антивир», акупунктура, воспаление, цитокины

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, Н.Ю. Калиновская, Е.Ю. Филатова,
И.В. Ширинский «Комбинированная терапия больных
с метаболическим фенотипом остеоартрита:
поисковое исследование» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 5. С. 933–942.
doi: 10.15789/1563-0625-СТО-2046

© Ширинский В.С. и соавт., 2020

For citation:

V.S. Shirinsky, N. Yu. Kalinovskaya, E. Yu. Filatova,
I. V. Shirinsky “Combination treatment of patients with
metabolic phenotype of osteoarthritis: an exploratory study”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 5, pp. 933–942.
doi: 10.15789/1563-0625-СТО-2046

DOI: 10.15789/1563-0625-СТО-2046

COMBINATION TREATMENT OF PATIENTS WITH METABOLIC PHENOTYPE OF OSTEOARTHRITIS: AN EXPLORATORY STUDY

Shirinsky V.S., Kalinovskaya N.Yu., Filatova E.Yu., Shirinsky I.V.

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

Abstract. Treatment of osteoarthritis (OA) patients with comorbidities can be challenging due to adverse events and non-sufficient efficacy of modern drugs. A safe and effective alternative could be the methods of traditional medicine and their combinations. The aim of this study was to evaluate efficacy and safety of combination of curcuma-based parapharmaceutical preparation and acupuncture in metabolic phenotype of OA (MPOA). The trial design was pilot open-label “before – after” study with the duration of 12 weeks. The patients with MPOA received parapharmaceutical preparation Epigenorm Antivir in a daily dose of 1000 mg and underwent 15-20 sessions of classical acupuncture.

We enrolled twenty three women with metabolic syndrome (MS), clinical and radiographic signs of gonarthrosis, mean age 66.5 years, mean body mass index 34.5. At the end of treatment there was a decrease in pain levels according to visual analogue scale (VAS) (before 65 (12.7), after 24.6 (21.0), $p = 0.001$), WOMAC pain scale (before 210.6 (102.2), after 103 (80.8), $p = 0.014$), KOOS (before 47.8 (12.1), after 66.7 (16.2), $p = 0.001$). The treatment resulted in statistically significant improvement of daily and social activities, role functioning, and quality of life. The results were clinically significant as evidenced by the moderate (Cohen $d > 0.5$) and large (Cohen $d > 0.8$) effect sizes of most outcome changes in accordance with the Cohen classification. The clinical improvement was accompanied by the decrease in MS components – LDL cholesterol (before 3.26 (0.26) mmol/l, after 2.43 (0.2) mmol/l, $p = 0.001$), triglycerides (before 2.02 (0.16) mmol/l, after 1.31 (0.1) mmol/l, $p = 0.005$). The treatment resulted in the reduction of systemic inflammation as evidenced by the decrease in the concentrations of TNF α (before 15.9 (1.2) pg/ml, after 12.4 (0.8), $p = 0.002$), histamine (before 1.6 (0.2) ng/ml, after 0.7 (0.2) pg/ml, $p = 0.034$), IL-18 (before 208.8 (32.6) pg/ml, after 160.0 (26.0) pg/ml, $p = 0.002$) and CRP (before 6.05 (1.3) mg/l, after 3.2 (0.7) mg/l, $p = 0.022$). At the same time there was an increase of concentration of IL-10 (before 1.5 (0.7) pg/ml, after 3.8 (1.2), $p = 0.006$) and adiponectin (before 34.0 (5.6) pg/ml, after 40.0 (6.9), $p = 0.034$). The treatment was well tolerated, no serious adverse events were registered. The pleiotropic actions of combination treatment occurred probably due to synergistic effects of herbal therapies and acupunctures. The results provide a rationale for larger scale, randomized controlled double-blind clinical trials.

Keywords: osteoarthritis, metabolic syndrome, Epigenorm Antivir, acupuncture, inflammation, cytokines

Введение

Метаболический фенотип остеоартрита (ОА) [3] – ОА ассоциированный с метаболическим синдромом (МС), возникает в результате сочетания метаболических нарушений – висцерального ожирения, сахарного диабета, инсулинорезистентности, дислипидемии, гиперурикемии с артериальной гипертензией [1, 3]. Частота МС в популяции лиц старше 18 лет колеблется от 10 до 30%, в России она варьирует от 20 до 35% [1, 6]. Эпидемиологические исследования свидетельствуют о более высокой частоте МС при ОА (59 против 23% без ОА) [23], причем у лиц молодого возраста ОА ассоциировался с пятикратным увеличением риска МС. Показан повышенный риск развития остеоартрита, независимо от локализации, у пациентов с МС [23]. Предполагается, что ОА и составляющие МС взаимосвязаны одним патофизиологическим процессом – си-

стемным низкоуровневым воспалением [10, 13]. Эта гипотеза основана на экспериментальных и клинических данных, свидетельствующих о нарушении системной регуляции дифференцировки, пролиферации, апоптоза, активности клеток тканей сустава, клеток жировой ткани, иммунной системы, как при ОА, так и при МС [10].

Лечение коморбидных заболеваний является одной из актуальных проблем медицины, поскольку число коморбидных больных с возрастом неуклонно растет во всем мире, а терапия характеризуется неизбежной полипрагматизацией [8]. Поэтому разработка новых препаратов с многоцелевым (противовоспалительным, иммуномодулирующим, анальгетическим, липидкорректирующим пр.) действием представляется обоснованной. Требованиям плеiotропности отвечают некоторые препараты и парафармацевтики растительного происхождения [18]. Произ-

водителем (ООО «Доктор Корнилов», г. Барнаул, Россия. www.dokskor.ru) совместно с ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия) был разработан инновационный парафармацевтик «Эпигенорм антивир» (ЭА) плейотропного терапевтического действия. Благодаря свойствам входящих в его состав компонентов и технологии их обработки, он обладает многоцелевым влиянием на клетки-мишени различных функциональных систем – иммунную, нервную и эндокринную. «Эпигенорм антивир»® (№ регистрации: RU.77.99.88.003.E.002022.04.17 от 27.04.2017) содержит в своем составе экстракт корня солодки (источник глицирризиновой кислоты), экстракт корня куркумы (источник куркумина), экстракт зеленого чая (источник катехинов), экстракт листьев облепихи (источник полифенолов), витамин С. Форма выпуска: желатиновые капсулы с общим содержанием растительных компонентов 500 мг. Клинические испытания ЭА у больных метаболическим синдромом показали его эффективность в отношении всех составляющих синдрома [7].

В документах 67-й Генеральной ассамблеи ВОЗ, посвященных народной медицине, в частности традиционной китайской медицине (ТКМ), указано, что интеграция методов научной и народной медицины должна осуществляться на основе результатов качественных клинических испытаний, соответствующих принципам доказательной медицины [26]. В ряде работ показано анальгетическое действие применения акупунктуры у больных остеоартритом [20, 27]. Ранее нами была показана эффективность применения акупунктуры у больных остеоартритом в сочетании с сахарным диабетом 2 [9].

Исследований, изучавших эффективность и безопасность комбинированного лечения фитотерапией и акупунктурой у больных ОА, не проводилось. Можно предположить, что одновременное использование двух методов традиционной медицины приведет к аддитивным или синергическим эффектам.

Целью исследования являлась оценка эффективности, безопасности фармакодинамике применения «Эпигенорм антивир» в сочетании с акупунктурой у больных метаболическим фенотипом ОА (МФОА).

Материалы и методы

Дизайн исследования – пилотное исследование «до – после».

В исследование включались пациенты с МФОА, удовлетворявшие критериям ОА и МС и имевшие показатели уровня боли и здоровья по ВАШ более 50 мм.

Диагноз «ОА коленного сустава» устанавливался согласно критериям Американской коллегии ревматологов (ACR) 1986 года, МС соответственно рекомендациям Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК) [4]:

– наличие у пациента абдоминального ожирения (окружность талии (ОТ) > 80 см у женщин и > 94 см у мужчин) и двух из следующих пяти критериев:

1) артериальная гипертензия (артериальное давление $\geq 140/90$ мм рт. ст.);

2) повышение уровня триглицеридов (ТГ) $\geq 1,7$ ммоль/л;

3) снижение уровня липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) < 1,0 ммоль/л у мужчин и < 1,2 ммоль/л у женщин;

4) повышение уровня липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) > 3,0 ммоль/л;

5) гипергликемия натощак (уровень сахара в крови $\geq 6,1$ ммоль/л) или нарушение толерантности к глюкозе (показатель в плазме крови через 2 ч после нагрузки глюкозой $\geq 7,8$, но $\leq 11,1$ ммоль/л).

Всем больным проводилась рентгенография коленных суставов с последующей оценкой изменений по критериям Kellgren–Lawrence, согласно которым в 100% случаев у больных зарегистрирована 2-3-я рентгенологическая стадия гонартроза.

Больные получали «Эпигенорм антивир» вточной дозе 1000 мг в течение 12 недель. В первый месяц лечения пациентам назначался курс классической акупунктуры, на основе синдромального диагноза, который устанавливали приглашенные врачи из Университета Традиционной китайской медицины (Тянь-цзин, Китай). Чаще всего у обследованных диагностировался синдром «Пустоты почек» (SHENXU), количество сеансов акупунктуры назначалось индивидуально, ежедневно, на курс 15-20.

Прием нестероидных противовоспалительных средств за время 12 недель лечения не допускался, больные прекращали принимать НПВС за 30 дней до начала исследования. В качестве «терапии спасения», в период усиления болей разрешалось использование ацетаминофена до 3 г в сутки в течение 2-3 дней. Для лечения гипертонической болезни (ГБ) больные постоянно принимали гипотензивные препараты в виде моно- или комбинированной терапии. Оценка функции суставов, заполнение опросников и забор крови проводились до приема пациентами ЭА на первом (Н0) и последнем (Н12) визитах. На промежуточных визитах (Н4 и Н8) проводились оценка безопасности, физикальное обследование, измерение уровня боли по ВАШ.

Первичной конечной точкой была оценка уровня боли по визуальной аналоговой шкале (ВАШ).

Вторичные конечные точки – выраженности боли, нарушения функции и других симптомов ОА, которые проводились по шкалам KOOS (Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score) [24], WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index) [12]. В начале исследования всем больным осуществлялась оценка индекса коморбидности CIRS – G (Cumulative Illness Rating Scale for Geriatrics) [21]. Уровень системного воспаления и цитокинов определяли с помощью оценки содержания TNF α , IL-6, IL-10, IL-18 (АО «Вектор-Бест», Россия), адипонектина (Abscam, UK), СРБ (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия) в сыворотке периферической крови с помощью стандартных наборов для ИФА соответственно инструкциям фирм-производителей. Антитела к коллагену 2 (CoL2Ab) в сыворотке крови оценивали с использованием набора фирмы MyBioSource.com., содержание неоптерина с помощью набора фирмы IBL International, гистамина – набора фирмы LDN, концентрацию липидов определяли стандартным методом.

Статистический анализ

Описательная статистика представлена медианой и межквартильными интервалами, средней арифметической и стандартным отклонением. Различие между средними величинами оценивалось с помощью парного t-критерия Стьюдента.

Интерпретация размера эффекта по Cohen: 0,2 – малый, 0,5 – умеренный, 0,8 – большой.

Результаты

В исследование были включены 23 женщины с метаболическим синдромом, клиническими и рентгенологическими признаками гонартроза.

В таблице 1 представлены основные анамнестические и клинические характеристики обследованных больных. Обращает на себя внимание то, что все пациентки были пожилого возраста, страдающие, согласно критериям экспертов ВОЗ, «ожирением» с длительностью заболевания ОА и гипертонической болезнью 7 лет, с умеренными показателями индекса коморбидности.

В таблице 2 показано влияние комбинированного лечения на выраженность суставного синдрома у больных МФОА.

Из таблицы видно, что сочетанная терапия в течение 12 недель приводит к выраженному анальгетическому эффекту, о чем свидетельствуют снижение в 2,5 раза уровня боли, оцениваемой по ВАШ, а также по субшкалам боли WOMAC и KOOS. Отмечено двукратное уменьшение показателя интенсивности постоянной боли, числа болезненных суставов. Клинически значимое снижение боли ассоциируется с уменьшением показателей утренней скованности, улучшением показателей повседневной и спортивной активности больного, качества жизни. Важно отметить, что размер перечисленных эффектов был,

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ОА В СОЧЕТАНИИ С МС

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH OA AND MS

Показатели Parameters	Больные ОА в сочетании с МС Patients with OA and MS n = 23
Возраст (годы) Age (years)	65,5 (61,5-70,5)
Масса тела (кг) Body mass (kg)	90 (85-100)
Окружность талии (см) Waist circumference (cm)	108,5 (104,5-115,0)
ИМТ (кг/м ²) BMI (kg/m ²)	34,5 (32,00-36,65)
Продолжительность заболевания ОА (годы) Duration of OA (years)	7 (3-10)
Продолжительность ГБ (годы) Duration of hypertension (years)	7 (4-10)
Показатель CIRS-G CIRS-G	10,5 (8-11)

Примечание. В графах – медиана и межквартильные интервалы.

Note. Medians and interquartile ranges are presented in the columns.

ТАБЛИЦА 2. КЛИНИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВЫРАЖЕННОСТИ СУСТАВНОГО СИНДРОМА У БОЛЬНЫХ МФОА ДО И ПОСЛЕ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

TABLE 2. CLINICAL PARAMETERS OF JOINT SYNDROME IN PATIENTS WITH MPOA BEFORE AND AFTER COMBINATION THERAPY

Показатели Parameters	До лечения (Н0) Before treatment (W0)	После лечения (Н12) After treatment (W12)	p value	Размер эффекта Effect size
Уровень боли (ВАШ) Pain level (VAS)	65 (12,7)	24,6 (21,0)	0,001	2,3
Показатель здоровья (ВАШ) General health (VAS)	57,6 (15,8)	23,7 (20,5)	0,001	1,8
Выраженность постоянной боли (баллы) Level of continuous (pain)	10,9 (4,8)	5,2 (6,4)	0,015	1,07
WOMAC боль WOMAC pain	210,6 (102,2)	103 (80,8)	0,014	1,16
WOMAC скованность WOMAC stiffness	91,5 (41,36)	48,6 (46,08)	0,015	0,97
WOMAC функция WOMAC function	713,3 (318,3)	363 (344)	0,012	1,05
WOMAC общий WOMAC total	1016,9 (445)	519 (491,2)	0,010	1,06
KOOS симптомы KOOS symptoms	46,0 (16,5)	66,0 (19,1)	0,001	-1,092
KOOS боль KOOS pain	47,8 (12,1)	66,7 (16,2)	0,001	-1,4
KOOS ежедневная активность KOOS activities of daily life	47,7 (12,59)	65,4 (18,02)	0,001	-1,2
KOOS спортивная активность KOOS sport and recreation	25,3 (14,8)	46,3 (24,5)	0,001	-1,03
KOOS качество жизни KOOS quality of life	27,0 (16,8)	40,9 (19,2)	0,009	-0,8
KOOS общий показатель KOOS total	40,8 (7,34)	59,7 (16,5)	0,001	-1,5
Число болезненных суставов Tender joint count	2,00 (0,34)	0,61 (0,77)	0,001	2,3
Число припухших суставов Swollen joint count	0,22 (0,5)	0,11 (0,47)	0,542	0,21

Примечание. В этой и последующих аналогичных таблицах в графах – средняя арифметическая и среднеквадратическое отклонение.

Note. In this and subsequent similar tables mean and standard deviation are presented.

по классификации Cohen, умеренным (Cohen $d > 0,5$) или высоким (Cohen $d > 0,8$).

Необходимо отметить, что у всех наблюдавшихся больных за 12 недель лечения не зарегистрировано ни одного эпизода гипертонического криза и терапия гипотензивными препаратами не претерпела изменений. У двух пациентов че-

рез неделю после начала сеанса акупунктуры отмечено кратковременное (2-3 дня) усиление болей в коленных суставах, которые не потребовали назначения анальгетиков. Других нежелательных (серьезных и несерьезных) явлений за все время приема «Эпигенорм антивир» и проведения курса акупунктуры у больных не отмечено.

В таблице 3 представлены данные о содержании в сыворотке ПК больных МФОА С-реактивного белка и ряда про- и противовоспалительных цитокинов в начале и через 12 недель комбинированного лечения. Из таблицы следует, что в конце лечения в сыворотке ПК больных в 2 раза снизился уровень С-реактивного протеина, статистически значимо уменьшилась концентрация провоспалительных цитокинов – TNF α , IL-18 и медиатора тучных клеток гистамина. В то же время содержание цитокинов с противовоспалительной активностью – адипонектина и IL-10 увеличилось.

Таблица 4 иллюстрирует результаты определения содержания в сыворотке ПК больных МФОА липидов, антител к коллагену II и неоптерина при комбинированном лечении в динамике.

Установлено, что комбинированная терапия больных МФОА к концу лечения приводит к статистически значимому снижению содержания в сыворотке ПК общего холестерина, холестерина ЛПНП, триглицеридов, а также снижению уровня неоптерина.

Обсуждение

Таким образом, лечение больных гонартрозом, в сочетании с МС, отечественным парафар-

мацевтиком «Эпигенорм антивир» в комбинации с курсом акупунктуры в течение 12 недель, оказывает выраженный клинический эффект как в отношении основного заболевания – ОА, так и некоторых составляющих МС. Лечение существенно уменьшало постоянные боли в коленных суставах, улучшало показатели повседневной и социальной активности, ролевых функций, некоторые показатели качества жизни. Клинический эффект ассоциировался со снижением содержания компонентов МС – общего холестерина сыворотки ПК, холестерина ЛПНП, триглицеридов и уменьшении индекса атерогенности. Помимо этого, комбинированное лечение оказало системное противовоспалительное действие, которое заключалось в уменьшении содержания провоспалительных и увеличении противовоспалительных цитокинов, снижения уровня СРБ. Обращает на себя внимание антигистаминное действие терапии, поскольку в последние годы возрос интерес к медиатору тучных клеток гистамину, как одному из компонентов реализации воспаления у больных ОА [16]. Основываясь на этих данных, а также результатах наших исследований [25] обсуждается возможность лечения ОА антигистаминными препаратами. Примечательно, что в конце лечения зарегистрировано

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ СРБ, ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ ПК БОЛЬНЫХ МФОА ДО И ПОСЛЕ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 3. CONCENTRATIONS OF CRP, PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE PERIPHERAL BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH MPOA BEFORE AND AFTER THE COMBINATION THERAPY

Показатели Parameters	До лечения (H0) Before treatment (W0)	После лечения (H12) After treatment (W12)	p value
С-реактивный белок (мг/л) C-reactive protein (mg/l)	6,05 (1,3)	3,2 (0,7)	0,022
TNFα (пг /мл) TNF α (pg/ml)	15,9 (1,2)	12,4 (0,8)	0,002
IL-6 (пг /мл) IL-6 (pg/ml)	10,6 (3,3)	2,3 (0,5)	0,120
IL-10 (пг /мл) IL-10 (pg/ml)	1,5 (0,7)	3,8 (1,2)	0,006
IL-18 (пг /мл) IL-18 (pg/ml)	208,8 (32,6)	160,0 (26,0)	0,002
Адипонектин (нг/мл) Adiponectin (ng/ml)	34,0 (5,6)	40,0 (6,9)	0,034
Гистамин (нг/мл) Histamine (ng/ml)	1,6+0,2	0,7 (0,2)	0,034

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА В СЫВОРОТКЕ ПК БОЛЬНЫХ МФОА ДО И ПОСЛЕ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 4. CONCENTRATIONS OF LIPIDS AND PARAMETERS OF HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH MPOA BEFORE AND AFTER COMBINATION TREATMENT

Показатели Parameters	До лечения (H0) Before treatment (W0)	После лечения (H12) After treatment (W12)	p value
Антитела к CoL2Ab (нг/мл) Antibodies to CoL2Ab (ng/ml)	37,0 (11,1)	51,7 (10,4)	0,267
Неоптерин (нг/мл) Neopterin (ng/ml)	2,6 (0,2)	1,6 (0,3)	0,022
Общий холестерин (ммоль/л) Total cholesterol (mmol/l)	6,33 (0,35)	5,0 (0,24)	0,024
Холестерин ЛПНП (ммоль/л) LDL-cholesterol (mmol/l)	3,26 (0,26)	2,43 (0,2)	0,001
Холестерин ЛПВП (ммоль/л) HDL-cholesterol (mmol/l)	1,27 (0,1)	1,35 (0,12)	0,260
Триглицериды (ммоль/л) Triglycerides (mmol/l)	2,02 (0,16)	1,31 (0,1)	0,005
Индекс атерогенности Atherogenic index	3,52 (0,27)	3,06 (2,3)	0,001

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

снижение концентрации одного из интегральных биомаркеров клеточного иммунитета неоптерина, при этом содержание маркера специфического гуморального иммунитета антител к CoL2Ab не изменилось.

Известно, что пациенты с МС имеют высокий риск развития сердечно-сосудистых болезней, инвалидности и преждевременной смерти. Эти факты определяют необходимость формирования новой стратегии лечения, предусматривающей терапию не только МС, но и предупреждения риска возникновения сопутствующих болезней. Нам представляется, что в решении этих задач могут помочь препараты с многоцелевым действием, к числу которых относятся фитопрепараты, в частности соединения, полученные из корневища *Curcuma longa*. Противовоспалительное, иммуномодулирующее, липидкорректирующее, противоопухолевое и др. действие куркумы показано в ряде исследований [14, 15]. В рандомизированных, плацебо-контролируемых исследованиях показано анальгетическое действие экстрактов куркумы у больных гонартрозом [19, 22]. Напомним, что одна капсула парафармацевтика ЭА содержит 60 мг экстракта корня *Curcuma longa*, другие растительные компоненты ЭА, по мнению разработчиков, способствуют биодоступности экстракта куркумы. Выраженный

клинический эффект комбинированного лечения не исключает возможность синергического действия куркумы, остальных компонентов ЭА и акупунктуры в реализации плейотропного эффекта у больных МФОА. В пользу такого предположения свидетельствуют ряд наблюдений. В 2009 г. был опубликован метаанализ эффективности применения акупунктуры при различных болевых синдромах, включая заболевания опорно-двигательного аппарата [20]. В исследование включено 13 работ, общее число пациентов составило 2 149 человек, из них 943 лечились «фальшивой» акупунктурой (sham acupuncture). Авторы пришли к заключению, что применение акупунктуры оказывает болеутоляющее действие. В 2005 г. в журнале “Lancet” опубликованы результаты рандомизированных, контролируемых клинических испытаний эффективности применения акупунктуры у больных с ОА коленных суставов [27]. Контрольная группа пациентов получал sham acupuncture. Через 8 недель лечения зарегистрировано статистически значимое уменьшение боли и симптомов по индексу WOMAC. Клинический эффект был нестойкий и через 52 недели наблюдения авторы не выявили отличий показателей WOMAC между опытной и контрольной группами. Следует отметить, что в этих немногочисленных работах авторы иссле-

дований не учитывали влияние полиморбидной патологии (соматических, нервно-психических заболеваний) на чувствительность к боли и на эффективность акупунктуры. Нами было показано, что курс классической акупунктуры у больных диабет-ассоциированным ОА вызывает умеренный анальгетический эффект, улучшает показатели физического и психического здоровья по SF-36, но не оказывает системного плейотропного действия [9].

Есть основания предполагать, что акупунктура вносит свой вклад в реализацию противовоспалительного эффекта опосредованно, благодаря своему обезболивающему действию влияя на патогенетическую связь: «боль – депрессия – нарушения цикла сон – бодрствование» [5]. Ранее нами было показано, что больные МФОА характеризуются признаками умеренной депрессии [11]. Результаты метаанализа, в котором оценивалось 24 исследования, посвященных изучению содержания 9 цитокинов в сыворотке ПК у больных депрессией, показали значительно повышение уровня только IL-6 и TNF α [17]. Таким образом, акупунктура, действуя на начальное звено указанной патогенетической цепочки, может, наряду с фитотерапией, оказывать противовоспалительное действие способствуя снижению содержания IL-6 и TNF α .

В нашей работе установлено, что в конце лечения регистрируется статистически значимое снижение содержания в сыворотке ПК атерогенных фракций липидов и это позволяет предполагать антиатерогенное действие комбинированной терапии. В пользу этого предположения говорит также двукратное снижение в сыворотке ПК содержания С-реактивного белка – маркера системного воспаления и развития атеросклероза [2].

Заключение

Результаты оценки эффективности и безопасности применения ЭА в сочетании с акупункту-

рой у больных МФОА в пилотных исследованиях внушают оптимизм, поскольку свидетельствуют о многоцелевом действии комплексного вмешательства: обезболивающим, противовоспалительном, иммуномодулирующем, антиатерогенном. Эти эффекты, видимо, обусловлены синергическим эффектом взаимодействия лекарственных трав и акупунктуры. Установленные свойства дают основания для проведения более масштабных, контролируемых слепых, рандомизированных клинических испытаний. Цель исследований – получение доказательных данных об эффективности и безопасности приема парафармацевтика ЭА в сочетании с классической акупунктурой у больных МФОА, сведений о возможности снижения числа принимаемых препаратов и прямых затрат на терапию, благодаря плейотропному действию комбинированного вмешательства.

Конфликт интересов

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

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме НИР 044.

Соответствие принципам этики

Протокол клинического исследования «Пилотное исследование эффективности и безопасности, фармакодинамики применения капсул «Эпигенорм антивир» и акупунктуры у больных остеоартритом в сочетании с метаболическим синдромом», форма информационного листа пациента, регистрационная карта были одобрены на заседании локального этического комитета НИИФКИ 29 июня 2018 года (протокол № 108).

Регистрация протокола

Протокол исследования зарегистрирован в базе данных ClinicalTrials.gov, регистрационный номер NCT03540186.

Список литературы / References

1. Алексеева Л.И., Таскина Е.А., Кашеварова Н.Г., Шарاپова Е.П., Аникин С.Г., Стребкова Е.А., Короткова Т.А., Раскина Т.А., Зонова Е.В., Оттева Э.Н. Остеоартрит коленных суставов и метаболический синдром: новые подходы к терапии // Научно-практическая ревматология, 2018. Т. 56, № 2. С. 157-163. [Alekseeva L.I., Taskina E.A., Kashevarova N.G., Sharapova E.P., Anikin S.G., Strebkova E.A., Korotkova T.A., Raskina T.A., Zonova E.V., Otteva E.N. Knee osteoarthritis and metabolic syndrome: new approaches to therapy. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2018, Vol. 56, no. 2, pp. 157-163. (In Russ.)]
2. Генкель В.В., Кузнецова А.С., Сумеркина В.А., Салашенко А.О., Лебедев Е.В., Шапошник И.И. Увеличение уровня высокочувствительного С-реактивного белка как маркер мультифокального атеросклероза у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями // Медицинский совет, 2019. Т. 16. С. 86-93. [Genkel V.V., Kuznetsova A.S., Sumerkina V.A., Salashenko A.O., Lebedev E.V., Shaposhnik I.I. Increase in high-sensitive C-reactive protein as a marker of polyvascular disease in patients with cardiovascular diseases. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2019, Vol. 16, pp. 86-93. (In Russ.)]

3. Головач И.Ю. Метаболический фенотип остеоартрита. Современные взгляды на патогенез, механизмы прогрессирования и подходы к лечению // Украинський ревматологічний журнал, 2018. № 71 (1). [Golovach I.Yu., Metabolic phenotype of osteoarthritis. Current views on pathogenesis, mechanisms of progression, and treatment approaches. *Ukrainskiy revmatologicheskii zhurnal = Ukrainian Journal of Rheumatology*, 2018, no. 71 (1). (In Russ.)]
4. Диагностика и лечение метаболического синдрома. В кн.: Сборник национальных клинических рекомендаций. М.: Силиция-Полиграф, 2009. С. 106-143. [Diagnosis and treatment of metabolic syndrome. In book: Collection of National Clinical Recommendations]. Moscow: Silitseya-Poligraf, 2009, pp. 106-143.
5. Коршунов Н.И., Речкина Е.В., Филатова Ю.С., Яльцева Н.В. Остеоартрит и депрессия // Научно-практическая ревматология, 2018. Т. 56, № 1. С. 93-98. [Korshunov N.I., Rechkina E.V., Filatova Yu.S., Yaltseva N.V. Osteoarthritis and depression. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2018, Vol. 56, no. 1, pp. 93-98. (In Russ.)]
6. Рудой А.С., Черныш О.В. Метаболический синдром: современный взгляд на проблему // Военная медицина, 2016. № 1. С. 107-114. [Rudoy A.S., Chernysh O. V. Metabolic syndrome: a modern view on the problem. *Voennaya meditsina = Military Medicine*, 2016, no. 1, pp. 107-114. (In Russ.)]
7. Савкин И.В., Гольдина И.А. Клиническая эффективность нутрицевтика эпигеном-направленного действия при метаболическом синдроме // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12, № 4. С. 736-738. [Savkin I.V., Goldina I.A. Clinical efficiency of nutraceuticals with the epigenom-directed action at the metabolic syndrome. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12, no. 4, pp. 736-738. (In Russ.)]
8. 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, Vol. 58 (9S), pp. 29-38. (In Russ.)]
9. Ширинский В.С., Величкина О.В., Ширинский И.В., Козлов В.А. Эффективность акупунктуры у больных с диабет-ассоциированным остеоартритом // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина, 2015. Т. 13, № 3. С. 25-30. [Shirinsky V.S., Velichkina O.V., Shirinsky I.V., Kozlov V.A. Efficacy of acupuncture in patients with diabetes-associated osteoarthritis. *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya, klinicheskaya medicina = Bulletin of Novosibirsk State University. Series: Biology, Clinical Medicine*, 2015, Vol. 13, no. 3, pp. 25-30. (In Russ.)]
10. 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. [Shirinsky V.S., Kazygashева E.V., Shirinsky I.V. Inflammation and immunity: a role of 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.
11. Ширинский В.С., Калиновская Н.Ю., Филатова К.Ю., Ширинский И.В. Клиническая и иммунологическая характеристика метаболического фенотипа остеоартрита // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 327-334. [Shirinsky V.S., Kalinovskaya N.Yu., Filatova K.Yu., Shirinsky I.V. Clinical and immunological features of metabolic phenotype of osteoarthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 327-334. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CAI-1881.
12. Bellamy N., Buchanan W.W., Goldsmith C.H., Campbell J., Stitt L.W. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J. Rheumatol.*, 1988, no. 15, pp. 1833-1840.
13. Berenbaum F., Griffin T.M., Liu-Bryan R. Metabolic regulation of inflammation in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 2017, Vol. 69, no.1, pp. 9-21.
14. Boyanapalli S.S., Tony Kong A.N. “Curcumin, the king of spices”: epigenetic regulatory mechanisms in the prevention of cancer, neurological, and inflammatory diseases. *Curr. Pharmacol. Rep.*, 2015, Vol. 1, pp. 129-139.
15. Buhmann C., Mobasher A., Busch F., Aldinger C., Stahlmann R., Montaseri A., Shakibaei M. Curcumin modulates nuclear factor kappa B-mediated inflammation in human tenocytes *in vitro*: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.*, 2011, Vol. 286, no. 32, pp. 28556-28566.
16. de Lange-Brokaar B.J., Kloppenburg M., Andersen S.N., Dorjée A.L., Yusuf E., Herb-van Toorn L., Kroon H.M., Zuurmond A.M., Stojanovic-Susulic V., Bloem J.L., Nelissen R.G., Toes R.E., Ioan-Facsinay A. Characterization of synovial mast cells in knee osteoarthritis: association with clinical parameters. *Osteoarth. Cartilage*, 2016, Vol. 24, no. 4, pp. 664-671.
17. Dowlati Y., Herrmann N., Swardfager W., Liu H., Sham L., Reim E.K., Lanctôt K.L. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol. Psychiatry*, 2010, Vol. 1, no. 67 (5), pp. 446-457.
18. Harvey A.L., Edrada-Ebel R., Quinn R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2015, Vol. 14, no. 2, pp. 111-129.
19. Madhu K., Chanda K., Saji M.J. Safety and efficacy of Curcuma longa extract in the treatment of painful knee osteoarthritis: a randomized placebo-controlled trial. *Inflammopharmacology*, 2013, Vol. 21, no. 2, pp. 129-136.
20. Madsen M.V., Gotzsche P.C. Acupuncture treatment for pain systematic review of Randomized clinical trials with acupuncture, placebo acupuncture, and acupuncture groups. *Br. Med. J.*, 2009, Vol. 27, pp. 338-346.

21. Miller M.D., Paradis C.F., Honck P.R., Mazumdar S., Stack J.A., Rifai A.H. Rating chronic medical illness burden in geropsychiatric practice and research application of the Cumulative illness Rating Scale. *Psychiatry Res.*, 1992. Vol. 41, no. 3, pp. 237-242.

22. Nakagawa Y., Mukai S., Yamada S., Matsuoka M., Tarumi E., Hashimoto T., Tamura C., Imaizumi A., Nishihira J., Nakamura T. Short-term effects of highly-bioavailable curcumin for treating knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled prospective study. *J. Orthop. Sci.*, 2014, Vol. 19, pp. 933-939.

23. Puenpatom R.A., Victor T.W. Increased prevalence of metabolic syndrome in individuals with osteoarthritis: an analysis of NHANES III data. *Postgrad. Med.*, 2009, Vol. 121, pp. 9-20.

24. Roos E.M., Roos H.P., Lohmander L.S., Ekdahl C., Beynon B.D. Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) – development of a self-administered outcome measure. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*, 1998, no. 28, pp. 88-96.

25. Shirinsky I., Shirinsky V. H₁-antihistamines are associated with lower prevalence of radiographic knee osteoarthritis: a cross-sectional analysis of the Osteoarthritis Initiative data. *Arthritis Res. Ther.*, 2018, Vol. 20, 116. doi: 10.1186/s13075-018-1619-7.

26. WHA 67.18 – Traditional Medicine. WHA Resolution; Sixty-seventh World Health Assembly, 2014. Available at: <https://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js21462ar/>.

27. Witt C., Brinkhaus B., Jena S., Linde K., Streng A., Wagenpfeil S., Hummelsberger J., Walther H.U., Melchart D., Willich S.N. Acupuncture in patients with osteoarthritis of the knee: a randomised trial. *Lancet*, 2005. Vol. 366, pp. 136-143.

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

Калиновская Н.Ю. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Филатова Е.Ю. — клинический ординатор 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

Kalinovskaya N.Yu., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Filatova E.Yu., Clinical Resident, 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 01.05.2020

Отправлена на доработку 06.05.2020

Принята к печати 08.05.2020

Received 01.05.2020

Revision received 06.05.2020

Accepted 08.05.2020

ИЗВЕСТНЫЕ И МАЛОИЗУЧЕННЫЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ И ВАЗОАКТИВНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА ПРИ КАПИЛЛЯРНОЙ ГЕМАНГИОМЕ СЕТЧАТКИ

Нероев В.В., Балацкая Н.В., Новикова А.Ю., Рябина М.В., Илюхин П.А.

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

Резюме. В настоящее время патогенез развития капиллярной гемангиомы сетчатки изучен недостаточно. В связи с этим исследование уровней цитокинов в биологических жидкостях представляется весьма актуальным с целью расширения знаний о механизмах развития заболевания и поиска таргетной терапии. В представленном исследовании изучено содержание в сыворотке крови, слезной жидкости и стекловидном теле гемопоэтических и вазоактивных факторов роста у пациентов с капиллярной гемангиомой сетчатки. Всего обследовано 26 пациентов с ангиоматозом сетчатки. В качестве контроля использовали пробы сыворотки крови ($n = 23$) и слезной жидкости ($n = 10$) практически здоровых людей в возрасте от 22 до 46 ($27,4 \pm 1,4$ года) лет. Для сравнительной оценки концентраций цитокинов в стекловидном теле пациентов с капиллярной гемангиомой сетчатки использовали образцы стекловидного тела 6 пациентов (средний возраст $33 \pm 4,7$ года; от 21 до 49 лет) с регматогенной отслойкой сетчатки. Концентрацию цитокинов в пробах определяли методом мультиплексного анализа на платформе xMAP в программе LumineXxPONENT 3.1, с помощью наборов ProcartaPlex (eBioscience, Австрия). В результате проведенной работы получена подробная характеристика вазоактивных факторов при капиллярной гемангиоме сетчатки. Выявлены нарушения в хемокиновой регуляции. В сыворотке крови было выявлено достоверное увеличение концентраций 3 вазоактивных факторов – PDGF-BB, HGF и PlGF-1, при снижении хемокинов – MCP-1, MIP-1 α и MIP-1 β . Частота выявления PlGF-1 и MIP-1 α также достоверно отличалась от группы контроля. SCF достоверно чаще определялся у пациентов с ангиоматозом сетчатки только на системном уровне. Показаны корреляционные связи между показателями PDGF-BB и PlGF-1, а также PlGF-1 и MIP-1 β . В слезной жидкости показано достоверное увеличение концентраций VEGF-A, HGF, VEGF-D, а также MCP-1. Отмечена инверсия концентраций PDGF-BB в сыворотке крови и слезной жидкости. Анализ внутриглазных уровней цитокинов выявил достоверное увеличение концентраций VEGF-A и HGF, при выраженном снижении MIP-1 α и MIP-1 β . Фактор роста PDGF-BB в 100% случаев определялся только в стекловидном теле пациентов с ангиоматозом сетчатки. С учетом выявленных характерных сдвигов

Адрес для переписки:

Новикова Анна Юрьевна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца»
Министерства здравоохранения РФ
105062, Россия, Москва, ул. Садовая-Черногрязская,
14/19.
Тел.: 8 (905) 726-28-83.
E-mail: ayukolesnikova@gmail.com

Address for correspondence:

Novikova Anna Yu.
Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases
105062, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-
Chernogryazskaya str., 14/19.
Phone: 7 (905) 726-28-83.
E-mail: ayukolesnikova@gmail.com

Образец цитирования:

В.В. Нероев, Н.В. Балацкая, А.Ю. Новикова, М.В. Рябина, П.А. Илюхин «Известные и малоизученные гемопоэтические и вазоактивные факторы роста при капиллярной гемангиоме сетчатки» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 943-956. doi: 10.15789/1563-0625-PAL-2002
© Нероев В.В. и соавт., 2020

For citation:

V.V. Neroyev, N.V. Balatskaya, A.Yu. Novikova, M.V. Ryabina, P.A. Ilyukhin "Proven and less studied hematopoietic and vasoactive growth factors in retinal capillary hemangioma", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 943-956. doi: 10.15789/1563-0625-PAL-2002
DOI: 10.15789/1563-0625-PAL-2002

интраокулярной продукции HGF/SF при капиллярной гемангиоме сетчатки, представляется актуальным поиск способов его ингибирования, что может стать основой новой терапевтической стратегии в лечении ангиоматоза сетчатки.

Ключевые слова: капиллярная гемангиома сетчатки, ген *VHL*, синдром Гиппеля–Линдау, патогенез, цитокины

PROVEN AND LESS STUDIED HEMATOPOIETIC AND VASOACTIVE GROWTH FACTORS IN RETINAL CAPILLARY HEMANGIOMA

Neroev V.V., Balatskaya N.V., Novikova A.Yu., Ryabina M.V.,
Plyukhin P.A.

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

Abstract. Pathogenesis of retinal capillary hemangioma has not been sufficiently studied at the present time. Therefore, the study of cytokine levels in biological fluids seems to be very relevant in order to increase knowledge about the mechanisms of the disease development and searching for targeted therapies. The content of hematopoietic and vasoactive growth factors in blood serum, lacrimal fluid, and vitreous body was studied in patients with retinal capillary hemangioma. A total of 26 patients with retinal angiomas were examined. The samples of blood serum ($n = 23$) and lacrimal fluid ($n = 10$) from practically healthy people aged 22 to 46 (27.4 ± 1.4 years) were used as a control. To perform comparative assessment of cytokine concentrations in the vitreous body of patients with retinal capillary hemangioma, were used samples of the vitreous body from 6 patients (average age 33 ± 4.7 years; from 21 to 49 years) with rhegmatogenous retinal detachment. To measure the cytokine concentrations, we applied multiplex analysis technique using the xMAP platform with LuminexXPONENT 3.1 program and ProcartaPlex sets (eBioscience, Austria). A detailed characteristic of vasoactive factors in capillary retinal hemangioma was obtained as a result of this work. Some disorders in chemokine regulation were identified. There was a significant increase in serum concentrations of three vasoactive factors, i.e., PDGF-BB, HGF, and PIGF-1, with a decrease in chemokines (MCP-1, MIP-1 α , and MIP-1 β). The frequencies of PIGF-1 and MIP-1 α detection also significantly differed from the control group. SCF was significantly more often determined in patients with retinal angiomas only at the systemic level. Correlations between PDGF-BB and PIGF-1, as well as PIGF-1 and MIP-1 β were shown. A significant increase in VEGF-A, HGF, VEGF-D, as well as MCP-1 concentrations was shown in the lacrimal fluid. The inversion of PDGF-BB concentrations in serum and lacrimal fluid was noted. Analysis of intraocular cytokine levels revealed a significant increase in VEGF-A and HGF concentrations, with marked decrease in MIP-1 α and MIP-1 β . PDGF-BB in 100% of cases was determined only in vitreous body of patients with retinal angiomas. With respect to the revealed characteristic shifts of HGF/SF intraocular production in retinal capillary hemangioma, it seems relevant to search ways for its inhibition, thus providing potential basis for a new therapeutic strategy in treatment of retinal angiomas.

Keywords: retinal capillary hemangioma, *VHL* gene, von Hippel–Lindau syndrome, pathogenesis, cytokines

Введение

Капиллярная гемангиома сетчатки (КГС) — это доброкачественная сосудистая опухоль, гистологическая структура которой представлена капилляроподобными каналами, окруженными вакуолизированной стромой и мелкими опухоле-

подобными клетками, экспрессирующими маркеры стволовых клеток [13, 51].

Довольно часто КГС выявляется в сочетании с синдромом Гиппеля–Линдау (синдромом von Hippel–Lindau (*VHL*)). Синдром *VHL* относится к орфанным, аутосомно-доминантным, мультисистемным прогрессирующим заболеваниям,

возникает в результате мутаций в гене-супрессоре опухолевого роста *VHL* (ген *VHL*) и ассоциирован с развитием целого ряда доброкачественных и злокачественных опухолей, а также кист различных локализаций [17, 49]. Частота встречаемости синдрома *VHL* достаточно низка и варьирует в различных популяциях от 1:36000 до 1:85000, при этом пенетрантность заболевания составляет более 52% для пациентов в возрасте 30 лет и достигает 95% к возрасту 60 лет [16, 45, 49].

КГС встречается у 68-85% пациентов с синдромом *VHL* и в 43-50% случаев регистрируется как первое проявление данного заболевания [8, 45, 52, 54]. Средний возраст пациентов на момент постановки диагноза составляет около 25 лет [15].

Наряду с наследственными ангиоматозами сетчатки, отмечаются также спорадические случаи их возникновения [46, 54]. По данным исследования Neumann Н.Р.Н., Chang J.Н. и соавт. [15, 40], частота спорадических случаев КГС составляет 15%.

Несмотря на доброкачественный характер КГС и, как правило, медленное прогрессирующее течение, прогноз для зрительных функций всегда остается весьма неблагоприятным. При росте КГС возникают осложнения экссудативного и тракционного характера, которые могут привести к необратимой потере зрения и инвалидизации [2].

Поэтому разработка подходов к ранней диагностике ангиоматоза сетчатки является актуальной задачей, так как позволит сохранить зрение и обеспечить пациентам высокое качество жизни.

Ввиду высокой частоты встречаемости КГС при синдроме *VHL*, своевременная ее диагностика определяет дальнейшее обследование и выявление других системных проявлений заболевания, что крайне важно для сохранения жизни пациентов.

Отсутствие целенаправленной терапии КГС в первую очередь обусловлено недостаточно изученным патогенезом; также неизвестными остаются факторы, вызывающие прогрессирование заболевания.

На сегодня известно более 1500 герминальных и соматических мутаций гена *VHL* [41].

В условиях нормы его белковый продукт (pVHL) связывается с гидроксильрованным гипоксия-индуцибельным фактором 1 α (HIF-1 α) и служит компонентом распознавания комплекса E3-убиквитинлигазы, включающего Cul2 (Cullin2), Elongin B и C и Rbx1 (Ring-boxprotein1). В условиях нормоксии E3-убиквитинлигаза от-

вечает за полиубиквитинирование HIF-1 α с последующей его протеасомной деградацией [39]. При мутациях в гене *VHL* недеградированный HIF-1 α образует гетеродимер с HIF-1 β , последний транслоцируется в ядро и приводит к усилению экспрессии генов целого ряда цитокинов, в первую очередь, медиаторов ангиогенеза: васкулоэндотелиального (VEGF-A), тромбоцитарного (PDGF-BB) и трансформирующего фактора роста (TGF), эритропоэтина (Epo) [22]. Кроме того, по данным Nordstrom-O'Brien M. и соавт., поражения *VHL* гена ассоциируются с продукцией фактора роста фибробластов (FGF) и эпидермального фактора роста (EGF) [41].

Следует отметить, что вышеуказанные вазоактивные соединения VEGF-A и PDGF-BB, в частности характер их системной продукции, наиболее хорошо изучены в клинике синдрома *VHL*, однако в литературе встречается крайне ограниченное количество данных, непосредственно касающихся их локального (внутриглазного) синтеза при КГС [10, 14, 21, 27, 29, 36, 43].

В настоящее время появляется все больше сообщений о новых цитокиновых молекулах, ответственных за рост сосудов, таких как: плацентарный фактор роста (PlGF-1), фактор роста гепатоцитов (HGF), имеющий также другое название – рассеивающий фактор (SF), а также медиатор лимфангиогенеза VEGF-D [10, 11, 12, 20, 37, 43]. Роль этих медиаторов при КГС сетчатки остается неизученной.

Известно, что ангиогенез и воспаление являются важными звеньями в патогенезе различных глазных заболеваний. Имеются работы, свидетельствующие о нарушении со стороны локальной продукции целого ряда хемокинов: макрофагальных белков воспаления 1 α и 1 β (MIP-1 α и MIP-1 β), моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1), при увеальной меланоме, пролиферативной диабетической ретинопатии и регматогенной отслойке сетчатки [18, 28, 48]. Роль этих медиаторов в возникновении и развитии ангиоматоза сетчатки в настоящее время также остается неопределенной.

Данные немногочисленных публикаций (базирующихся на результатах иммуногистохимических исследований и электронной микроскопии) свидетельствуют о том, что опухолевой пролиферации при КГС подвержено несколько типов клеток [24].

Полагают, что в формировании КГС вносят вклад стволовые клетки костного мозга. Так, в исследовании Chi-Chao Chan и соавт. [13]

продемонстрировано, что опухолеподобные клетки КГС экспрессировали маркеры CD133⁺ и CD34⁺.

Имеются данные, отражающие изменения концентрации факторов гемопоэза в крови, в частности, факторов стволовых клеток (SCF) и стромальных клеток-1α (SDF-1α), при КГС и других системных поражениях ассоциированных с синдромом *VHL* [13, 14, 33, 47, 59].

Проведение целенаправленного исследования локальной и системной продукции вышеуказанных факторов при КГС является очень актуальным, т.к. позволит получить новые знания о патогенезе, выделить потенциальные биологические маркеры для диагностики и прогноза данного заболевания, способствовать определению возможных молекул для разработки таргетной терапии ангиоматоза сетчатки.

Цель работы — определение содержания известных и малоизученных вазоактивных и гемопоэтических факторов роста в сыворотке крови (СК) и жидкостных средах глаза (слезной жидкости (СЖ) и стекловидном теле (СТ)) пациентов с КГС.

Материал и методы

Обследованы 26 пациентов с КГС (рис. 1 А, Б; см. 3-ю стр. обложки), проходивших лечение в отделе патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России.

Общая характеристика больных представлена в таблице 1.

У 15 (57,7%) пациентов КГС обнаружена в ассоциации с болезнью Гиппеля–Линдау. Системные проявления заболевания характеризовались наличием гемангиобластомы мозжечка и/или спинного мозга, кист почек и поджелудочной железы, карциномы почки. В 7 случаях (27%) имелись анамнестические данные о наследственном характере заболевания.

Диагноз «КГС» был установлен на основании анамнеза и данных стандартных и специальных офтальмологических методов исследования. Всем пациентам проводилось комплексное обследование, которое включало: визометрию, тонометрию, рефрактометрию, статическую периметрию, биомикроскопию, офтальмоскопию,

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ С КГС

TABLE 1. MAIN CHARACTERISTICS OF THE GROUP OF PATIENTS WITH RETINAL CAPILLARY HEMANGIOMA

Характеристика Characteristic	Значение Value
Количество пациентов Number of patients	26
Пол, мужчины/женщины Gender, men/women	10/16
Средний возраст (min-max) Average age (min-max)	30 (19-53)
Монолатеральное поражение Monolateral lesion	13 (50%)
Билатеральное поражение Bilateral lesion	13 (50%)
Ассоциация КГС с синдромом VHL Association of RCH with <i>VHL</i> syndrome	15 (57,7%)
Гемангиобластома мозжечка Cerebellar hemangioblastoma	12 (80%)
Гемангиобластома спинного мозга Spinal cord hemangioblastoma	10 (66,7%)
Кисты почек Kidney cysts	6 (40%)
Кисты поджелудочной железы Pancreatic cysts	4 (26,7%)
Карцинома почки Renal cell carcinoma	1 (6,7%)

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Характеристика Characteristic	Значение Value
Количество глаз Number of eyes	39
Среднее количество опухолей в одном глазу (min-max) Average number of tumors in one eye (min-max)	2,3 (1-9)
Локализация КГС в глазу, количество КГС Localization of RCH in the eye, the number of RCH	102
Крайняя или средняя периферия сетчатки Extreme or middle periphery of the retina	(92,7%)
Юкстапапиллярная локализация* Juxtapapillary localization*	8 (7,3%)
Экссудативные осложнения КГС, количество глаз Exudative complications of RCH, number of eyes	
Локальная отслойка сетчатки в области КГС Local retinal detachment in the area of RCH	12 (30,8%)
Распространенная отслойка сетчатки Widespread retinal detachment	6 (15,4%)
Тотальная отслойка сетчатки Total retinal detachment	2 (5,1%)
Макулярный отек Macular edema	16 (41%)
Отложение твердого экссудата Deposition of hard exudate	21 (53,8%)
Вторичная глиальная пролиферация, число глаз Secondary glial proliferation, number of eyes	
Эпиретинальный фиброз в зоне КГС Epiretinal fibrosis over the RCH	22 (56,4%)
Макулярная эпиретинальная мембрана Epimacular membrane	17 (43,6%)
Геморрагические осложнения КГС, число глаз Hemorrhagic complications of RCH, number of eyes	
Геморрагии в зоне КГС Hemorrhages in the area of RCH	8 (20,5%)
Частичный гемофтальм Partial hemophthalmus	1 (2,6%)

Примечание. * – к юкстапапиллярной локализации были отнесены образования, расположенные на зрительном нерве или в прилегающей к нему сетчатке.

Note. Tumors located on the optic nerve or in the retina adjacent to it were classified as juxtapapillary localization.

фундус-фоторегистрацию, флюоресцентную ангиографию, оптическую когерентную томографию сетчатки и ультразвуковое исследование с использованием режимов В-сканирования, эходенситометрии, цветового доплеровского картирования и импульсной доплерографии.

7 больным (4 женщинам и 3 мужчинам, средний возраст $25,1 \pm 3,5$ года) с КГС, осложненной отслойкой сетчатки, было проведено хирургическое лечение.

Иммунологические исследования выполнялись на базе отдела иммунологии и вирусологии

ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России.

Забор крови и СЖ проводили до каких-либо манипуляций. СЖ (без стимуляции) отбиралась стерильной градуированной пипеткой из нижнего конъюнктивального свода в объеме 25-50 мкл в микропробирки «Eppendorf». Кровь забирали из локтевой вены в стерильные вакуумные пробирки без активатора свертывания. СК получали, используя стандартные методики.

Забор проб СТ выполнялся непосредственно в начале хирургического вмешательства (витрэктомии).

Контролем служил материал СК (n = 23) и СЖ (n = 10) практически здоровых людей в возрасте от 22 до 46 (27,4±1,4 года) лет. Группу сравнения для оценки концентраций цитокинов в СТ пациентов с КГС сетчатки составили 6 пациентов

(средний возраст 33±4,7 года; от 21 до 49 лет) с регматогенной отслойкой сетчатки (РОС).

До проведения исследования собранный биоматериал хранился при температуре -70 °С. Концентрацию цитокинов в пробах определяли методом мультиплексного анализа на платформе xMAP (прибор «MAGPIX», Luminex Corporation, США) в программе Luminexx PONENT 3.1, с помощью наборов Procarta Plex (eBioscienc, Австрия).

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 12.0 (StatSoftInc, США). Оценка нормальности распределения проведена методом Колмогорова–Смирнова. Учитывая распределение части параметров, отличное от нормального, сравнительный анализ проводился непараметрическими методами. Показатели содержания цитокинов в биологических жидкостях представлены в

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В СК ПАЦИЕНТОВ С КГС

TABLE 2. CONTENT OF CYTOKINES (pg/ml) IN THE BS OF PATIENTS WITH RCH

Цитокин Cytokine	КГС / RCH (n = 26)				Контроль / Control (n = 23)			
	Частота выявления Detection rate		Min-Max	M±m	Частота выявления Detection rate		Min-Max	M±m
	абс. abs.	%			абс. abs.	%		
VEGF-A	23	88,5	22,7-2817,2	407,1±117,5	23	100	30,4-2441,0	401,0±138,6
PDGF-BB	26	100	22,2-615,1	387,8±34,1* p ≤ 0,001 ↑	22	95,7	8,5-568,2	109,6±27,5
HGF	26	100	27,1-336,2	112,0±18,2* p = 0,02 ↑	21	91,3	5,94-171,80	76,4±11,2
PIGF-1	24* p ≤ 0,001	92,3	8,1-472,3	173,5±34,5* p ≤ 0,001 ↑	6	26,1	3,91-194,60	39,1±13,7
VEGF-D	5	19,2	3,2-18,9	6,7±3,1	3	13	6,0-17,4	11,5±3,3
MIP-1α	5* p ≤ 0,001	19,2	2,3-12,1	5,4±1,2* p = 0,002 ↓	19	82,6	3,8-60,5	17,5±3,7
MIP-1β	14	53,8	12,2-76,2	33,1±4,6* p ≤ 0,001 ↓	16	69,6	19,3-367,5	186,4±23,0
MCP-1	22	84,6	6,1-138,6	40,0±7,7* p = 0,02 ↓	21	91,3	11,9-244,0	85,5±14,2
SCF	22* p = 0,01	84,6	1,66-23,20	6,3±0,8 ↑	11	47,8	2,6-8,8	4,8±0,6
SDF-1α	24	92,3	92,7-597,3	284,4±22,0	21	91,3	103,6-960,4	347,8±56,5

Примечание. n – количество проб; * – достоверность отличия показателей относительно контроля (p < 0,05).

Note. n, number of samples; *, reliability of the differences in indicators in comparison with the control group (p < 0.05).

формате: $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего значения. Для определения достоверности различий (p) показателей двух независимых выборок использовали U -критерий Манна–Уитни. При сравнении частот выявления цитокинов использовался точный критерий Фишера. Корреляционный анализ проводился с использованием непараметрического рангового r -коэффициента Спирмена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным $p < 0,05$.

Результаты

Результаты исследования содержания цитокинов в СК пациентов с КГС представлены в таблице 2.

При исследовании образцов СК были выявлены достоверные изменения в концентрации 6 цитокинов: увеличение содержания таких vasoактивных факторов, как: PDGF-BB, HGF

и PIGF-1, при снижении уровня хемокинов – MCP-1, MIP-1 α и MIP-1 β . При этом частота выявления PIGF-1 и MIP-1 α также достоверно отличалась от группы контроля. Несмотря на отсутствие различий в концентрациях SCF, обнаружено, что данный гемостатический фактор достоверно чаще определялся у пациентов с КГС (84,8% против 47,8%).

При проведении корреляционного анализа были выявлены сильная прямая связь между показателями PDGF-BB и PIGF-1 ($r = 0,8$; $p < 0,05$), а также обратная связь между PIGF-1 и MIP-1 β ($r = -0,8$; $p < 0,05$).

Анализ содержания цитокинов в СЖ (табл. 3) показал достоверное увеличение концентрации следующих факторов роста – VEGF-A, HGF, VEGF-D, а также MCP-1.

Анализ интраокулярных (в СТ) уровней цитокинов у пациентов с КГС выявил достоверное повышение содержания VEGF-A и HGF. В то же время показатели MIP-1 α и MIP-1 β оказались статистически значимо в 4 и 9 раз сниженными

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В СЖ ПАЦИЕНТОВ С КГС

TABLE 3. CONTENT OF CYTOKINES (pg/ml) IN THE TF OF PATIENTS WITH RCH

Цитокин Cytokine	КГС / RCH (n = 38)				Контроль / Control (n = 10)			
	Частота выявления Detection rate		Min-Max	M±m	Частота выявления Detection rate		Min-Max	M±m
	абс. / abs.	%			абс. / abs.	%		
VEGF-A	38	100	50,6-14420,8	3074,3±467,2* p = 0,03 ↑	9	90	214,5-2952,3	1627,1±314,1
PDGF-BB	38	100	22,2-255,7	106,6±10,1	10	100	6,6-189,9	76,5±24,4
HGF	38	100	28,0-7568,3	360±206,5* p = 0,02 ↑	10	100	46,9-156,3	97,3±11,6
PIGF-1	27	71,1	2,2-51,1	20,5±3,0	9	90	3,7-62,2	22,4±5,6
VEGF-D	13	34,2	7,5-21,0	12,7±1,3* p = 0,02 ↑	5	50	4,2-9,3	7,4±0,9
MIP-1 α	27	71,1	1,9-16,3	7,7±1,1	9	90	1,8-14,5	6,6±1,2
MIP-1 β	21	55,3	9,4-111,3	69,5±12,9	3	30	12,0-17,4	13,8±1,8
MCP-1	37	97,4	6,14-474,10	128,0±17,7* p = 0,006 ↑	10	100	6,7-107,3	46,0±11,0
SCF	20	52,6	1,6-14,4	4,6±0,8	7	70	2,1-6,3	4,01±0,60
SDF-1 α	38	100	48,3-1161,5	531,0±82,6	10	100	153,0-904,7	360,3±83,0

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В СТ ПАЦИЕНТОВ С КГС

TABLE 4. CONTENT OF CYTOKINES (pg/ml) IN THE VH OF PATIENTS WITH RCH

Цитокин Cytokine	КГС / RCH (n = 7)				Контроль / Control (n = 6)			
	Частота выявления Detection rate		Min-Max	M±m	Частота выявления Detection rate		Min-Max	M±m
	абс. / abs.	%			абс. / abs.	%		
VEGF-A	7	100	17,8-6222,2	2812,6±652,3* p = 0,008 ↑	6	100	17,8-619,8	329,2±102,1
PDGF-BB	7	100	6,6-26,5	20,0±2,8	–	–	–	в пробах не выявляется not detected in samples
HGF	7	100	78,8-8466,7	5595,2±982,2* p = 0,03 ↑	6	100	279,0 -2160,1	1136,8±275,5
PIGF-1	5	71,4	8,0-55,0	28,5±8,2	1	16,7	–	8,34
VEGF-D	6	85,7	11,3-35,7	25,2±3,4	2	33,3	2,8-3,0	2,9±0,1
MIP-1α	7	100	1,8-10,7	6,4±1,2* p = 0,003 ↓	6	100	22,0-43,7	26,7±3,4
MIP-1β	6	85,7	5,6-22,8	10,2±2,6* p = 0,003 ↓	6	100	80,4-117,2	92,87±5,40
MCP-1	7	100	43,3-4271,8	1743,6±496,6	6	100	462,6-7386,7	2397,5±1054,6
SCF	7	100	1,6-61,7	18,2±7,5	6	100	3,8-35,2	14,70±5,04
SDF-1α	7	100	129,0-377,2	206,7±35,0	6	100	151,8-213,2	197,3±9,5

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ми по сравнению с таковыми пациентов с РОС (табл. 4). PDGF-BB в 100% случаев определялся только в СТ пациентов с КГС.

Обсуждение

В настоящее время значимая роль в патогенезе заболеваний, характеризующихся процессами неоваскуляризации, отводится таким факторам роста, как VEGF-A и PDGF-BB.

VEGF-A является мощным митогеном для эндотелиальных клеток, повышает проницаемость сосудистой стенки, способствует синтезу медиаторов воспаления [3, 4].

Los. M и соавт. [36] в своем исследовании определяли концентрацию VEGF-A в жидкости передней камеры глаза, в СК, моче и жидкости, полученной из кист почек у пациентов с синдромом VHL. У 80% пациентов VEGF-A обнаруживался в жидкости передней камеры глаза, средняя концентрация которого составила 51±10 пг/мл

(диапазон от 22 до 111) и была достоверно выше (p < 0,001) в сравнении с контрольной группой. Следует отметить, что выявляемые у пациентов КГС были небольших размеров, а у некоторых поражение сетчатки вовсе не встречалось.

Было показано, что в гемангиобластомах VEGF-A могут экспрессировать стромальные и эндотелиальные клетки [44]. Значительные концентрации данного медиатора выявлялись как при опухолях, ассоциированных с болезнью Гиппеля–Линдау, так и при спорадических гемангиомах сетчатки.

PDGF-BB является многофункциональным ростовым фактором, который передает сигналы через PDGFR-α и PDGFR-β [56]. Помимо прямого влияния на ангиогенез путем индукции, пролиферации и миграции эндотелиальных клеток он также способствует ремоделированию, созреванию и стабилизации сосудов за счет привлечения перicyтов и сосудистых гладкомышечных клеток в новообразованные сосуды [5].

Кроме того, было показано, что PDGF-BB модулирует экстрамедуллярный гемопоэз и ангиогенез посредством активации продукции EPO в стромальном компартменте опухолей. Секретируемый опухолями, по эндокринному механизму, PDGF-BB способен попадать в кровоток и вызывать системные эффекты, дополнительно поддерживая рост новообразования за счет улучшения его питания и снабжения кислородом [57].

Известно, что в гемангиобластомах сетчатки, зрительного нерва и ЦНС обнаруживается экспрессия PDGF-BB, EPO и его рецепторов [10, 14, 27, 29].

PDGF-BB обладает способностью к индукции синтеза VEGF, что обуславливает поддержание пролиферации эндотелиальных клеток и перитцитов [35].

При анализе уровня цитокинов у пациентов с ангиоматозом сетчатки VEGF-A статистически значимо выявлялся в среднем на более высоком уровне в СЖ ($3074,3 \pm 467,2$ пг/мл) и СТ ($2812,6 \pm 652,3$ пг/мл), что отражает его активную локальную продукцию и согласуется с данными литературы о его участии в патогенезе КГС.

Обращает внимание инверсия концентраций PDGF-BB на системном и локальном уровне. Так, нами отмечалось достоверное увеличение содержания PDGF-BB ($387,8 \pm 34,1$ пг/мл, $p \leq 0,001$) в крови пациентов с КГС по сравнению с таковым в группе контроля, однако концентрации этого медиатора в СЖ были ниже, чем в СК, и сопоставимы с уровнем его локальной продукции ($106,6 \pm 10,1$ пг/мл, $p > 0,05$) в норме. Не исключено, что повышение сывороточной концентрации PDGF-BB могло быть обусловлено наличием системных опухолей у ряда пациентов с КГС, ассоциированных с синдромом *VHL* (табл. 1).

Обнаружение PDGF-BB в пробах СТ только пациентов с КГС отражает его непосредственное участие в патогенезе заболевания. В СТ концентрация была значительно ниже, чем в СЖ и СК.

По данным зарубежной литературы отмечается, что в развитии КГС также принимает участие PIGF-1. В исследованиях Natva E. и Bohling T. и соавт. [10, 23] было продемонстрировано, что стромальные клетки опухоли наряду с VEGF, его рецепторами VEGFR-1 и VEGFR-2 обильно экспрессируют PIGF.

PIGF является членом семейства VEGF и обладает высоким сродством к VEGFR-1 [43]. Экспрессия PIGF происходит преимущественно во время эмбрионального развития и обнаруживается в здоровых тканях и крови в достаточно не-

высоких концентрациях. PIGF прямо и косвенно способствует ангиогенезу. Показано, что прямое индуцирование осуществляется непосредственно через рецептор VEGFR-1; непрямой ангиогенез осуществляется путем препятствия связывания VEGF-A с VEGFR-1, приводя к его вытеснению и связыванию с VEGFR-2, обладающим самой сильной проангиогенной активностью, что дополнительно усиливает ангиогенный сигнал [7]. Кроме того, PIGF может выступать в роли хемотактанта для лейкоцитов, последние, в свою очередь, способствуют усилению ангиогенеза и воспалительного ответа [31].

В нашем исследовании частота выявления ($92,3\%$ ($n = 24$), $p \leq 0,001$) и средний уровень ($173,5 \pm 34,5$ пг/мл, $p \leq 0,001$) PIGF-1 были достоверно выше только в СК пациентов с ангиоматозом сетчатки.

Корреляционный анализ позволил выявить тесную системную взаимосвязь между показателями PDGF-BB и PIGF-1 ($r = 0,8$, $p < 0,05$) в СК.

Несмотря на отсутствие достоверного повышения локальной продукции PIGF-1, нельзя исключить его роль в развитии КГС, учитывая способность потенцировать действие VEGF-A, активировать VEGFR-2 и принимать участие в воспалительных процессах.

Помимо VEGF-A в опухолях головного мозга, таких как гемангиобластомы, астроцитомы, невриномы, менингиомы, глиобластомы, была обнаружена экспрессия VEGF-D [26]. В первую очередь VEGF-D является лимфангиогенным фактором и участвует в формировании и поддержании лимфатических сосудов, которые отсутствуют как в головном мозге, так и в глазу [6]. Предполагают, что данный фактор может принимать непосредственное участие в ангио- и лимфогенезе и процессах, способствующих прогрессированию и метастазированию опухолей.

В исследовании Weickhardt A.J. и соавт. было отмечено, что у пациентов с колоректальным раком высокая экспрессия VEGF-D в опухолевой ткани была предиктором устойчивости к бевацизумабу (Авастин) [55].

В группе пациентов с ангиоматозом сетчатки определялось достоверное локальное (СЖ) повышение VEGF-D в среднем до $12,7 \pm 1,3$ пг/мл, что может свидетельствовать о его участии в патогенезе заболевания. К сожалению, нам не удалось выявить достоверных отличий интраокулярной (в СТ) секреции VEGF-D, возможно, в силу небольшой выборки ($n = 7$). Однако его средний

показатель у пациентов с КГС почти в 7 раз превышал показатель пациентов с РОС.

Наибольший интерес представляет выявленная нами в группе пациентов с ангиоматозом сетчатки повышенная продукция HGF/SF в СК ($112,0 \pm 8,2$ пг/мл, $p = 0,02$), а также в СЖ ($360,0 \pm 206,5$ пг/мл, $p = 0,02$) и СТ ($5595,2 \pm 982,2$ пг/мл, $p = 0,03$). Следует отметить, что интраокулярный уровень HGF значительно превышал уровни всех остальных цитокинов выявляемых в СТ.

Такая активная продукция HGF/SF на локальном и системном уровнях явно указывает на его непосредственное участие в патогенезе заболевания. Данные исследований о содержании HGF/SF в биологических жидкостях при КГС в доступной литературе найдены не были.

В настоящее время известно, что HGF/SF является мощным митогеном для гепатоцитов, а также тесно связан с ангиогенезом, ростом, пролиферацией и дифференцировкой многих типов клеток, включая опухолевые клетки [37]. Установлено, что экспрессия белка HGF/SF тесно связана с мутациями гена *VHL* [42].

В исследованиях Sebulla С.М. и Cheng Y. было выявлено значительное повышение концентрации HGF во внутриглазной жидкости пациентов с ретинобластомой [27, 49].

Известно, что HGF/SF способен индуцировать экспрессию вазопротерогенных факторов VEGF и PlGF тем самым частично опосредуя свои ангиогенные свойства [12, 58]. Активация сигнальной системы HGF/SF может быть одной из причин устойчивости КГС к антиангиогенной терапии.

Синергизм действия HGF/SF и VEGF-A приводит к активации эндотелия с последующим увеличением синтеза ряда индукторов воспалительного сигнала – MCP-1, MIP-1 α и MIP-1 β [38].

Хемокины изначально были описаны как медиаторы, ответственные за рекрутирование лейкоцитов в очаг воспаления. Однако в последние годы стало ясно, что функция хемокинов выходит далеко за эти рамки. Так, в ряде работ описано их участие, как в физиологическом, так и в патологическом ангиогенезе при хроническом воспалении, фиброзе, опухолевом росте и метастазировании. Из группы СС-хемокинов наиболее изучен MCP-1. Это макрофагальный хемоаттрактант, играющий роль в инициации и поддержании воспаления, а также являющийся мощным индуктором ангиогенеза и фиброзной

пролиферации [25, 32]. Экспрессия MCP-1, как было показано, значительно коррелирует с уровнями VEGF, TNF α и IL-8 [9, 34, 50].

В исследовании Wang Y. и соавт. [53] отмечено, что для быстро прогрессирующих и резистентных к множественным интравитреальным введениям ингибитора ангиогенеза ранибизумаба КГС была характерна воспалительная инфильтрация Т-лимфоцитами и макрофагами.

В работе Коненкова В.И. и соавт. [1] было показано, что у женщин с миомой матки доброкачественный опухолевый рост сопровождался снижением содержания в СК таких хемокинов, как MCP-1, MIP-1 α и MIP-1 β . При этом снижение их концентраций прямо коррелировало между собой. Таким образом, происходит нарушение функционирования хемокиновой сети.

В нашем исследовании у пациентов с ангиоматозом также было отмечено достоверное снижение концентраций MCP-1 ($40,0 \pm 7,7$ пг/мл, $p = 0,02$), MIP-1 α ($5,4 \pm 1,2$ пг/мл, $p = 0,002$) и MIP-1 β ($33,1 \pm 4,6$ пг/мл, $p \leq 0,001$) как в СК, так и интраокулярно (в СТ), что отражает изменение со стороны регуляторных механизмов контроля над клеточной миграцией при КГС.

Предполагается, что циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки (EPC) при гемангиобластомах способны к миграции по оси SDF-1 α -CXCR-4 и последующей дифференцировке в зрелые эндотелиальные клетки [33, 59]. CXCR-4 представляет собой рецептор альфа-хемокинов, специфичный для SDF-1 α , который выступает в роли мощного хемоаттрактанта, а также регулирует пролиферацию клеток и их способность к выживанию [59].

Показано, что потеря функции белка *VHL* в гемангиобластомах ЦНС приводит к сверхэкспрессии CXCR-4, SDF-1 α и VEGF-A по сравнению с нормальной окружающей тканью [30]. Повышенная концентрация VEGF также способна приводить к увеличению SDF-1 α в сетчатке [14]. Высокий уровень экспрессии CXCR4 и SDF1 α был обнаружен как в стромальных, так и в эндотелиальных клетках КГС, связанных с болезнью Гиппеля–Линдау [33, 59]. Таким образом, SDF-1 α и VEGF генерируют мощный ангиогенный сигнал, что приводит к стимуляции процессов васкулогенеза в КГС.

SCF представляет собой плюрипотентный фактор роста, участвующий в ранних стадиях кроветворения, а также в развитии и функционировании половых клеток, меланоцитов и тучных клеток. Рецептором SCF является с-KIT, который

экспрессируется гемопоэтическими стволовыми клетками, ЕРС, тучными клетками, меланоцитами и зародышевыми клетками [48].

SCF и SDF-1 α усиливают хемотаксис нейрональных клеток-предшественников и могут действовать синергетически, стимулируя миграцию предшественников CD34 [19].

На основании этого в нашем исследовании мы изучили продукцию следующих факторов гемопоэза SDF-1 α и SCF.

Нам не удалось выявить достоверных изменений локальной концентрации SDF-1 α ; в СК уровень SDF-1 α не имел значимых отличий с таковым в группе здоровых.

Что касается SCF, то его концентрация в СК, СЖ и СТ также достоверно не отличалась от значений, полученных в контроле.

Однако SCF выявлялся достоверно в 1,8 раза чаще ($p = 0,01$) в СК пациентов с ангиоматозом сетчатки.

Не исключено, что SDF-1 α и SCF с различной степенью могут экспрессироваться на разных

этапах развития заболевания, однако это требует дальнейшего изучения.

Сравнительный анализ уровней цитокинов в подгруппах пациентов, сформированных в зависимости от особенностей клинической картины (локализация КГС, размер опухоли, наличие отслойки сетчатки, макулярного отека, эпиретинального фиброза, отложений липидного эксудата, геморрагических осложнений, системных проявлений синдрома VHL), не выявил каких-либо достоверных отличий.

Таким образом, проведено исследование и определены особенности продукции известных и малоизученных факторов ангиогенеза при КГС как на локальном, так и системном уровне, а также охарактеризованы нарушения в звене хемотаксисной регуляции.

Учитывая характерные сдвиги интраокулярной продукции HGF/SF при КГС, представляется актуальным поиск способов его ингибирования, что может стать основой новой терапевтической стратегии в лечении ангиоматоза сетчатки.

Список литературы / References

1. Коненков В.И., Королева Е.Г., Орлов Н.Б., Прокофьев В.Ф., Шевченко А.В., Новиков А.М., Дергачева Т.И. Изменения концентраций CCL-хемокинов (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES и Eotaxin) в сыворотке крови женщин с миомой матки // Акушерство и гинекология, 2019. № 8. С. 107-111. [Konenkov V.I., Koroleva E.G., Orlov N.B., Prokofyev V.F., Shevchenko A.V., Novikov A.M., Dergacheva T.I. Changes in the concentrations of CCL chemokines (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES and Eotaxin) in the blood serum of women with uterine myoma. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2019, no. 8, pp. 107-111. (In Russ.)]
2. Нероев В.В., Киселева Т.Н., Новикова А.Ю., Рябина М.В., Илюхин П.А., Рамазанова К.А. Дифференциальная диагностика капиллярных гемангиом сетчатки и вазопротролиферативных опухолей // Российский офтальмологический журнал, 2019. Т. 12, № 2. С. 39-47. [Neroev V.V., Kiseleva T.N., Novikova A.Yu., Ryabina M.V., Ilyukhin P.A., Ramazanova K.A. Differential diagnosis of retinal capillary hemangiomas and vasoproliferative tumors. *Rossiyskiy oftalmologicheskij zhurnal = Russian Journal of Ophthalmology*, 2019, Vol. 12, no. 2, pp. 39-47. (In Russ.)]
3. Нероев В.В., Зайцева О.В., Балацкая Н.В., Курчаева З.В. Интраокулярная и системная продукция эндотелина, эритропоэтина и VEGF-A при осложненной пролиферативной диабетической ретинопатии // Вестник КазНМУ, 2016. № 1. С. 257-262. [Neroev V.V., Zaytseva O.V., Balatskaya N.V., Kurchaeva Z.V. Intraocular and systemic levels of endothelin, erythropoietin and VEGF-A in complicated proliferative diabetic retinopathy. *Vestnik KazNMU = Bulletin of Kazakh National Medical University*, 2016, no. 1, pp. 257-262. (In Russ.)]
4. Чехонин В.П., Шеин С.А., Корчагина А.А., Гурина О.И. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза // Вестник РАМН, 2012. Т. 67, № 2. С. 23-34. [Chekhonin V.P., Shein S.A., Korchagina A.A., Gurina O.I. VEGF in neoplastic angiogenesis. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, Vol. 67, no. 2, pp. 23-34. (In Russ.)]
5. Abramsson A., Lindblom P., Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J. Clin. Invest.*, 2003, Vol. 112, pp. 1142-1151.
6. Achen M.G., Jeltsch M., Kukk E., Makinen T., Vitali A., Wilks A.F., Alitano K., Stacker A.S. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, Vol. 95, pp. 548-553.
7. Augustin A.J. Placenta growth factor (PlGF) and retinal vascular diseases-current knowledge from experimental and clinical studies. *Klin. Monbl. Augenheilkd.*, 2016, Vol. 233, no. 1, pp. 57-65.

8. Binderup M.L.M., Stendell A.S., Galanakis M., Møller H.U., Kiilgaard J.F., Bisgaard M.L. Retinal hemangioblastoma: prevalence, incidence and frequency of underlying von Hippel–Lindau disease. *Br. J. Ophthalmol.*, 2018, Vol. 102, no. 7, pp. 942-947.
9. Bingle L., Brown N. J., Lewis C.E. The role of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.*, 2002, Vol. 196, pp. 254-265.
10. Bohling T., Hatva E., Kujala M., Claesson-Welsh L., Alitalo K., Haltia M. Expression of growth factors and growth factor receptors in capillary hemangioblastoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1996, Vol. 55, pp. 522-527.
11. Cao R., Xue Y., Hedlund E.M., Zhong Z., Tristaris K., Tondelli B., Lucchini F., Zhu Z., Dissing S., Cao Y. VEGFR1-mediated pericyte ablation links VEGF and PlGF to cancer-associated retinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2010, Vol. 107, pp. 856-886.
12. Cebulla C.M., Jockovich M.E., Piña Y., Boutrid H., Alegret A., Kulak A., Hackam A.S., bhattacharya S.K., Feuer W.J., Murray T.G. Basic fibroblast growth factor impact on retinoblastoma progression and survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008, Vol. 49, no. 12, pp. 5215-5221.
13. Chan C.-C., Chew E.Y., Shen D., Hackett J., Zhuang Z. Expression of stem cells markers in ocular hemangioblastoma associated with von Hippel–Lindau (VHL) disease. *Mol. Vis.*, 2005, Vol. 11, pp. 697-704.
14. Chan C.-C., Collins A.B., Chew E.Y. Molecular pathology of eyes with von Hippel–Lindau (VHL) disease: a review. *Retina*, 2007, Vol. 27, no. 1, pp. 1-7.
15. Chang J.H., Spraul C.W., Lynn M.L., Drack A., Grossniklaus H.E. The two-stage mutation model in retinal hemangioblastoma. *Ophthalmic Genet.*, 1998, Vol. 19, no. 3, pp. 123-130.
16. Chew E.Y. Ocular manifestations of von Hippel–Lindau disease: clinical and genetic investigations. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 2005, Vol. 103, pp. 495-511.
17. Chou A., Toon C., Pickett J., Gill A.J. Von Hippel–Lindau syndrome. *Front. Horm. Res.*, 2013, Vol. 41, pp. 30-49.
18. Dunavoelgyi R., Funk M., Sacu S., Georgopoulos M., Zlabinger G., Zehetmayer M., Schmidt-Erfurth U. Intraocular activation of angiogenic and inflammatory pathways in uveal melanoma. *Retina*, 2012, Vol. 32, no. 7, pp. 1373-1384.
19. Dutt P., Wang J.F., Groopman J.E. Stromal cell-derived factor-1 alpha and stem cell factor/kit ligand share signaling pathways in hemopoietic progenitors: a potential mechanism for cooperative induction of chemotaxis. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, pp. 3652-3658.
20. Gille J., Khalik M., König V., Kaufmann R. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) induces vascular permeability factor (VPF/VEGF) expression by cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 1998, Vol. 111, no. 6, pp. 1160-1165.
21. Gossage L., Eisen T., Maher E.R. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat. Rev. Cancer.*, 2015, Vol. 15, no. 1, pp. 55-56.
22. Haddad N.M., Cavallerano J.D., Silva P.S. Von Hippel–Lindau disease: a genetic and clinical review. *Semin. Ophthalmol.*, 2013, Vol. 28, no. 5-6, pp. 377-386.
23. Hatva E., Böhling T., Jääskeläinen J., Persico M.G., Haltia M., Alitalo K. Vascular growth factors and receptors in capillary hemangioblastomas and hemangiopericytomas. *Am. J. Pathol.*, 1996, Vol. 148, no. 3, pp. 763-765.
24. Holt S.C., Bruner J.M., Ordoñez N.G. Capillary hemangioblastoma. An immunohistochemical study. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1986, Vol. 86, no. 4, pp. 423-429.
25. Hong K.H., Ryu J., Han K.H. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 4, pp. 1405-1407.
26. Jenny B., Harrison J.A., Baetens D., Tille J.C., Burkhardt K., Mottaz H., Kiss J.Z., Dietrich P.Y., De Tribolet N., Pizzolato G.P., Pepper M.S. Expression and localization of VEGF-C and VEGFR-3 in glioblastomas and haemangioblastomas. *J. Pathol.*, 2006, Vol. 209, no. 1, pp. 34-43.
27. Kaelin W.G. Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat. Rev. Cancer.*, 2002, Vol. 2, no. 9, pp. 673-682.
28. Kiang L., Ross B.X., Yao J., Shanmugam S., Andrews C.A., Hansen S., Besirli C.G., Zacks D.N., Abcouwer S.F. Vitreous cytokine expression and a murine model suggest a key role of microglia in the inflammatory response to retinal detachment. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2018, Vol. 59, no. 8, pp. 3767-3778.
29. Krieg M., Marti H.H., Plate K.H. Coexpression of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in nervous system tumors associated with von Hippel–Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Blood*, 1998, Vol. 92, no. 9, pp. 3388-3393.
30. Kruizinga R.C., van Marion D.M., den Dunnen W.F., de Groot J.C., Hoving E.W., Oosting S.F., Timmer-Bosscha H., Derks R.P., Cornelissen C., van der Luijt R.B., Links T.P., de Vries E.G., Walenkamp A.M. Difference in CXCR4 expression between sporadic and VHL-related hemangioblastoma. *Fam. Cancer.*, 2016, Vol. 15, no. 4, pp. 607-616.

31. Laviv Y., Wang J.L., Anderson M.P., Kasper E. Accelerated growth of hemangioblastoma in pregnancy: the role of proangiogenic factors and upregulation of hypoxia-inducible factor (HIF) in a non-oxygen-dependent pathway. *Neurosurg. Rew.*, 2017, Vol. 42, no. 2, pp. 209-226.
32. Lewis G.P., Chapin E.A., Luna G., Linberg K.A., Fisher S.K. The fate of Muller's glia following experimental retinal detachment: nuclear migration, cell division, and subretinal glial scar formation. *Mol. Vis.*, 2010, Vol. 16, pp. 1361-1372.
33. Liang X., Shen D., Huang Y., Yin C., Bojanowski C.M., Zhuang Z., Chan C.C. Molecular pathology and CXCR4 expression in surgically excised retinal hemangioblastomas associated with von Hippel-Lindau disease. *Ophthalmology*, 2007, Vol. 114, no. 1, pp. 147-156.
34. Liss C., Fekete M.J., Hasina R., Lam C.D., Lingen M.W. Paracrine angiogenic loop between head-and-neck squamous-cell carcinomas and macrophages. *Int. J. Cancer.*, 2001, Vol. 93, no. 6, pp. 781-785.
35. Lonser R.R., Glenn G.M., Walther M., Chew E.Y., Libutti S.K., Lineham W.M., Oldfield E.H. Von Hippel-Lindau disease. *Lancet*, 2003, Vol. 361, pp. 2059-2067.
36. Los M., Aarsman C.J., Terpstra L., Wittebol-Post D., Lips C.J., Blijham G.H., Voest E.E. Elevated ocular levels of vascular endothelial growth factor in patients with von Hippel-Lindau disease. *Ann. Oncol.*, 1997, Vol. 8, no. 10, pp. 1015-1022.
37. Miyazawa K., Tsubouchi H., Naka D., Takahashi K., Okigaki M., Arakaki N., Nakayama H., Hirono S., Sakiyama O., Takahashi K., Gohda E., Daikuhara Y., Kitamura N. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, Vol. 163, pp. 967-973.
38. Naim R., Tolnay E., Mueller K.M., Kuhnen C. Co-expression of VEGF, c-Met and HGF/SF in secondary pleural tumors. *Int. J. Mol. Med.*, 2004, Vol. 14, no. 5, pp. 787-791.
39. Neumann H.P., Wiestler O.D. Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. *Lancet*, 1991, Vol. 337, no. 8749, pp. 1052-1054.
40. Neumann H.P.H. Das von Hippel-Lindau Syndrom. *Pathologe*, 1993, Vol. 14, pp. 150-157.
41. Nordstrom-O'Brien M., van der Luijt R.B., van Rooijen E., van den Ouweland A.M., Majoor-Krakauer D.F., Lolkema M.P., van Brussel A., Voest E.E., Giles R.H. Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Hum. Mutat.*, 2010, Vol. 31, no. 5, pp. 521-537.
42. Oh R.R., Park J.Y., Lee J.H., Shin M.S., Kim H.S., Lee S.K., Kim Y.S., Lee S.H., Lee S.N., Yang Y.M., Yoo N.J., Lee J.Y., Park W.S. Expression of HGF/SF and Met protein is associated with genetic alterations of VHL gene in primary renal cell carcinomas. *APMIS*, 2002, Vol. 110, no. 3, pp. 229-238.
43. Peter A.C. Ocular neovascularization. *J. Mol. Med. (Berl)*, 2013, Vol. 91, no. 3, pp. 311-321.
44. Pierscianek D., Wolf S., Keyvani K., El Hindy N., Stein K.P., Sandalcioglu I.E., Sure U., Mueller O., Zhu Y. Study of angiogenic signaling pathways in hemangioblastoma. *Neuropathology*, 2017, Vol. 37, no. 1, pp. 3-11.
45. Schoen M.A., Shields C.L., Say E.A.T., Douglass A.M., Shields J.A., Jampol L.M. Clinically invisible retinal hemangioblastomas detected by spectral domain optical coherence tomography and fluorescein angiography in twins. *Retin. Cases. Brief. Rep.*, 2018, Vol. 12, no. 1, pp. 12-16.
46. Singh A., Shields J., Shields C. Solitary retinal capillary hemangioma: hereditary (von Hippel-Lindau disease) or nonhereditary? *Arch. Ophthalmol.*, 2001, Vol. 119, no. 2, pp. 232-234.
47. Staller P., Sulitkova J., Lisztwan J., Moch H., Oakeley E. J., Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*, Vol. 425, no. 6955, pp. 307-311.
48. Takahashi S., Adachi K., Suzuki Y., Maeno A., Nakazawa M. Profiles of inflammatory cytokines in the vitreous fluid from patients with rhegmatogenous retinal detachment and their correlations with clinical features. *Biomed. Res. Int.*, 2016, Vol. 2016, pp. 1-9.
49. Toy B.C., Agrón E., Nigam D., Chew E.Y., Wong W.T. Longitudinal analysis of retinal hemangioblastomatosis and visual function in ocular von Hippel-Lindau disease. *Ophthalmology*, 2012, Vol. 119, no. 12, pp. 2622-2630.
50. Varney M.L., Olsen K.J., Mosley R.L., Bucana C.D., Talmadge J.E., Singh R.K. Monocyte/macrophage recruitment, activation and differentiation modulate interleukin-8 production: a paracrine role of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis. *In Vivo*, 2002, Vol. 16, no. 6, pp. 471-477.
51. Vortmeyer A.O., Chan C.-C., Chew E.Y., Mattenson D.M., Shen D.F., Wellmann A., Weil R., Zhuang Z. Morphologic and genetic analysis of retinal angioma associated with massive gliosis in a patient with von Hippel-Lindau disease. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1999, Vol. 237, no. 6, pp. 513-517.
52. Wang H., Shepard M.J, Zhang C., Dong L., Walker D., Guedez L., Park S., Wang Y., Chen S., Pang Y., Zhang Q., Gao C., Wong W.T., Wiley H., Pacak K., Chew E.Y., Zhuang Z., Chan C.C. Deletion of the von Hippel-Lindau gene in hemangioblasts causes hemangioblastoma-like lesions in murine retina. *Cancer. Res.*, 2018, Vol. 78, no. 5, pp. 1266-1274.

53. Wang Y., Abu-Asab M.S., Shen D., Zhuang Z., Chew E.Y., Chan C.C. Upregulation of hypoxia-inducible factors and autophagy in von Hippel-Lindau-associated retinal hemangioblastoma. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2014, Vol. 252, no. 8, pp. 1319-1327.
54. Webster A.R., Maher E.R., Bird A.C., Gregor Z.J., Moore A.T. A clinical and molecular genetic analysis of solitary ocular angioma. *Ophthalmology*, 1999, Vol. 106, no. 3, pp. 623-629.
55. Weickhardt A.J., Williams D.S., Lee C.K., Chionh F., Simes J., Murone C., Wilson K., Parry M.M., Asadi K., Scott A.M., Punt C.J., Nagtegaal I.D., Price T.J., Mariadason J.M., Tebbutt N.C. Vascular endothelial growth factor D expression is a potential biomarker of bevacizumab benefit in colorectal cancer. *Br. J. Cancer.*, 2015, Vol. 113, pp. 37-45.
56. Westermarck B., Heldin C.H. Platelet-derived growth factor. Structure, function and implications in normal and malignant cell growth. *Acta Oncol.*, 1993, Vol. 32, no. 2, pp. 101-105.
57. Xue Y., Lim S., Yang Y., Wang Z., Jensen L.D., Hedlund E.M., Andersson P., Sasahara M., Larsson O., Galter D., Cao R., Hosaka K., Cao Y. PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 18, no. 1, pp. 100-110.
58. Yong C., Shufeng Z., Chung-Ting P., Mengke Y., Libin C., Yuou Y., Mingwei Z., Jianhong L. Analysis of aqueous humor concentrations of cytokines in retinoblastoma. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 5, e0177337. doi: 10.1371/journal.pone.0177337.
59. Zagzag D., Krishnamachary B., Yee H., Okuyama H., Chiriboga L., Ali M.A., Melamed J., Semenza G.L. Stromal Cell-derived factor-1A and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von Hippel-Lindau Loss-of-function induces expression of a ligand and its receptor. *Cancer. Res.*, 2005, Vol. 65, no. 14, pp. 6178-6188.

Авторы:

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

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

Новикова А.Ю. — аспирант отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Рябина М.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Илюхин П.А. — к.м.н., научный сотрудник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

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

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

Novikova A.Yu., Postgraduate Student, Department of Retinal and Optic Nerve Pathology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Ryabina M.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Retinal and Optic Nerve Pathology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Ilyukhin P.A., PhD (Medicine), Research Associate, Department of Retinal and Optic Nerve Pathology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Поступила 09.04.2020
Принята к печати 17.05.2020

Received 09.04.2020
Accepted 17.05.2020

ВЛИЯНИЕ СИЛИКОНОВОЙ МАММОПЛАСТИКИ НА ИММУНОЭНДОКРИННЫЙ СТАТУС ЖЕНЩИН- РЕЦИПИЕНТОК

**Золотых В.Г.¹, Гвоздецкий А.Н.¹, Ким А.Я.², Лапин С.В.³,
Михайлова Л.Р.³, Старовойтова Е.М.¹, Федоткина Т.В.¹,
Чурилов Л.П.^{1,4}, Шенфельд И.^{1,5}, Яблонский П.К.^{1,4}**

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

² ООО «СМ-клиника», Москва, Россия

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

⁴ ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Центр аутоиммунных заболеваний имени П. Заблудовича, Медицинский центр Шеба, Тель-Хашомер, Израиль

Резюме. Статья посвящена изучению раннего влияния силиконовых имплантатов молочных желез на развитие аутоиммунных реакций и динамику уровня пролактина и тиреоидных гормонов у женщин после маммопластики. На сегодня данный вопрос остается актуальным по ряду причин: в мире установлено более 20 миллионов пар имплантатов и число имплантаций непрерывно растет. Несмотря на относительную безопасность силиконовых эндопротезов, периодически те или иные из них попадают под запрет регулирующих организаций различных стран. При этом в научной литературе растет число публикаций как о наличии, так и об отсутствии неблагоприятных последствий их использования. Наличие силиконовых имплантатов некоторые авторы ассоциируют с риском развития аутоиммунных заболеваний, заболеваний соединительной ткани и даже онкологических заболеваний. С другой стороны, в научных журналах преобладают публикации о безопасной эксплуатации таких медицинских изделий пациентками. Данные противоречия, накопившиеся за последние годы, и послужили основанием для выполнения нашего исследования. В рамках его реализации с сентября 2018-го по ноябрь 2019-го у 27 пациенток до, через 3 и 6 месяцев после эстетических и реконструктивных маммопластик в сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа были изучены уровни аутоантител к десяти антигенам, а также содержание пролактина и тиреоидных гормонов. В результате проведенного исследования нами и обработки полученных данных было установлено, что у 5 из 27 пациенток после маммопластики наблюдалось изменение спектра и напряженности аутоиммунитета – концентрации аутоантител к модифицированному цитруллинированному виментину и аутоантител к кардиолипину класса IgM превысили уровень нормы в 3 и 6 месяцев. Кроме того, после

Адрес для переписки:

Золотых Валерий Геннадьевич
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Университетская наб., 7-9, пом. 1043-1046.
Тел.: 8 (981) 739-69-63.
E-mail: dr-zolotikh@yandex.ru

Address for correspondence:

Zolotikh Valeriy G.
St. Petersburg State University
199034, Russian Federation, St. Petersburg,
Universitetskaya emb., 7-9, rooms 1043-1046.
Phone: 7 (981) 739-69-63.
E-mail: dr-zolotikh@yandex.ru

Образец цитирования:

В.Г. Золотых, А.Н. Гвоздецкий, А.Я. Ким, С.В. Лапин, Л.Р. Михайлова, Е.М. Старовойтова, Т.В. Федоткина, Л.П. Чурилов, И. Шенфельд, П.К. Яблонский «Влияние силиконовой маммопластики на иммуноэндокринный статус женщин-реципиенток» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 957-968.
doi: 10.15789/1563-0625-IOS-2006

© Золотых В.Г. и соавт., 2020

For citation:

V.G. Zolotikh, A.N. Gvozdetzky, A.Ya. Kim, S.V. Lapin, L.R. Mikhailova, E.M. Starovoitova, T.V. Fedotkina, L.P. Churilov, Y. Shoenfeld, P.K. Yablonsky "Influence of silicone mammaplasty on the immunoendocrine status of female recipients", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 957-968.
doi: 10.15789/1563-0625-IOS-2006

DOI: 10.15789/1563-0625-IOS-2006

операций на молочной железе к 3 месяцу происходило падение изначально высокого у реципиенток маммопластики уровня пролактина до нормального диапазона, даже если до операции он был кратно повышен. Что касается тиреоидных гормонов, то статистически значимых изменений в их динамике обнаружено не было. Повышение аутоантител к различным антигенам-мишеням после маммопластики статистически значимо положительно коррелировало между собой. Это может объясняться, например, зависимостью от адьювантного воздействия силикона, не связанного с антигенной специфичностью, но стимулирующего иммунные ответы.

Ключевые слова: маммопластика, аутоиммунитет, пролактин, силикон, аутоантитела, адьювант, аутоиммунно-воспалительный синдром, индуцированный адьювантами (АСИА)

INFLUENCE OF SILICONE MAMMOPLASTY ON THE IMMUNOENDOCRINE STATUS OF FEMALE RECIPIENTS

Zolotykh V.G.^a, Gvozdetsky A.N.^a, Kim A.Ya.^b, Lapin S.V.^c,
Mikhailova L.R.^c, Starovoitova E.M.^a, Fedotkina T.V.^a, Churilov L.P.^{a, d},
Shoenfeld Y.^{a, e}, Yablonsky P.K.^{a, d}

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

^b LLC "CM Clinic", Moscow, Russian Federation

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

^d St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

^e P. Zabludowicz Center for Autoimmune Diseases, Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Israel

Abstract. The article concerns a study of early influence of silicone breast implants on the development of autoimmune reactions and dynamics of prolactin and thyroid hormone levels in women after mammoplasty. At the present time, this issue remains relevant for several reasons: more than 20 million pairs of implants have been installed in the world and the number of their implantations is constantly growing. Despite relative safety of the silicone implants, some of them are periodically banned by regulatory bodies in various countries. At the same time, there is a growing number of controversial publications in the scientific literature, about potential adverse consequences of their use. Some authors suggest an association between the silicone implants and risk of developing autoimmune conditions, connective tissue disorders, and occasional malignancies. On the other hand, the journals are full of publications about the overall safe tolerance of such medical devices by the patients. These considerations served as a pre-requisite to our research. As part of this project, we have assayed serum levels of autoantibodies to ten antigens, as well as contents of prolactin and thyroid hormones by means of ELISA technique in 27 patients before, 3 and 6 months after aesthetic and reconstructive mammoplastics performed within a period of September 2018 to November 2019. As a result, it was found that 5 out of 27 patients exhibited changes in the autoimmunity spectrum and intensity after mammoplasty. In particular, the concentrations of autoantibodies to modified citrullinated vimentin and IgM autoantibodies to cardiolipin exceeded the normal level at 3 and 6 months. In addition, the initially high prolactin concentration in mammoplasty recipients dropped to normal ranges by 3 months after breast surgery, even after several-fold increased initial levels. As for thyroid hormones, there were no statistically significant changes in their dynamics. The increase of autoantibodies to various target antigens after mammoplasty was statistically significant and positively correlated with each other. This can be explained, for example, by dependence on the adjuvant effect of silicone, which is not associated with antigen specificity. However, it may generally stimulate the immune responses.

Keywords: mammoplasty, autoimmunity, prolactin, silicone, autoantibodies, adjuvant, autoimmune-autoinflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA)

Работа поддержана грантом Правительства РФ (для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего образования, научных учреждениях государственных академий наук и государственных научных центрах Российской Федерации), договор № 14.W03.31.00009 от 13.02.2017 г.

Введение

В мире на сегодняшний день установлено более 20 миллионов пар имплантатов молочной железы. В 2018 году было выполнено 1 862 506 операций, направленных на увеличение молочных желез имплантатами, прирост по сравнению с 2014 годом составил 27,6% [15]. При этом тенденция к росту числа имплантаций непостоянна. С начала 1960-х годов силикон считался инертным и безопасным медицинским материалом, что содействовало бурному нарастанию практики его применения. Но после эпидемиологических исследований в начале 1990-х годов силиконовые грудные имплантаты были запрещены в США под давлением североамериканской общественности в связи с рисками для здоровья реципиентов, включая заболевания соединительной ткани и аутоиммунные болезни [16]. Более поздние эпидемиологические исследования не обнаружили статистически значимой связи между силиконовыми протезами и рисками этих заболеваний [14]. Поэтому в 2006 году в США были вновь одобрены силиконовые имплантаты от двух производителей: Allergan и Mentor.

Однако в 2011 году Y. Shoenfeld и соавт. обратили внимание на возникновение у ряда женщин, которым было выполнено протезирование молочной железы, нового адьювант-ассоциированного заболевания, индуцированного хроническим контактом с силиконом, и выдвинули концепцию существования особой нозологической формы — аутоиммунного/аутовоспалительного синдрома, индуцированного адьювантами (АСИА, ASIA) [2, 25].

Наконец, совсем недавно, 24 июля 2019 года, компания Allergan объявила о глобальном отзыве текстурированных грудных имплантатов и экспандеров линейки Biocell в связи с доказательствами статистически значимого увеличения риска развития анапластической крупноклеточной лимфомы, ассоциированной с имплантатами [17]. Надо отметить, что частота лимфом увеличивается при целом ряде аутоиммунных заболеваний (синдром Шегрена, тиреоидит Хасимото, аутоиммунные колиты и др.).

Такое «волнообразное» развитие событий подтверждает актуальность вопроса безопасно-

сти силиконовых имплантатов молочной железы. С одной стороны, растет число публикаций о развитии системных аутоиммунных заболеваний у женщин после имплантации содержащих силикон изделий [27], а с другой — многие авторы отрицают наличие причинно-следственной связи между силиконовой маммопластикой и аутоиммунными расстройствами [23].

В ходе самого масштабного на сегодня мультицентрового эпидемиологического исследования (99 993 женщины с силиконовыми или силиконовыми протезами) было установлено, что наличие грудных имплантатов с силиконовым наполнителем увеличивает риски возникновения некоторых аутоиммунных заболеваний (в 8 раз — синдрома Шегрена, в 7 раз — склеродермии, почти в 6 раз — ревматоидного артрита), а также может ассоциироваться с повышенной частотой мертворождений (более чем в 2 раза) и меланомы (почти в 4 раза) [11]. Важно подчеркнуть, что в ряде исследований была отмечена существенная роль индивидуальной реакции реципиента на имплантаты и высказано предположение об их опосредованном иммуно-нейро-эндокринном влиянии.

Стало очевидным, что одни только эпидемиологические исследования не могут привести к окончательному выводу о влиянии силикона на реактивность организма, что и явилось основанием для выполнения настоящей работы.

Пролактин, с одной стороны, служит главным регулятором состояния молочных желез, а с другой — мощным паракринным и эндокринным стимулятором иммунитета и аутоиммунитета [24]. Известны случаи галактореи после силиконовой маммопластики, в том числе и в нашей практике [28]. Аутоиммунные болезни щитовидной железы в настоящее время являются самыми распространенными аутоиммунными заболеваниями и эндокринопатиями вообще и ведущей причиной гипотиреоза в районах, где нет йодной недостаточности [3]. Тиреоидная и пролактиновая регуляция сложно взаимодействуют, в том числе и в отношении аутоиммунитета, причем гипотиреоз способствует гиперпролактинемии и зависимым от нее аутоиммунным реакциям [10], а аутоиммунный тиреоидит, по данным некоторых авторов, может являться причиной формирования фиброзной контрактуры периимплантатной капсулы [4]. Поэтому исследование состояния пролактиновой и тиреоидной регуляции при силиконовой маммопластике представляло особый интерес.

Материалы и методы

Было проведено контролируемое когортное проспективное нерандомизированное исследо-

вание, одобренное этическим комитетом СПбГУ (выписка из протокола №02-126 от 30.06.2017, дополнения одобрены 20.06.2018 и 17.11.2019 г.) и локальными этическими комитетами медицинских учреждений, на базе которых выполнялись операции.

В исследование были включены 27 пациенток, которым были выполнены операции на молочных железах по эстетическим (19 – первая группа) и реконструктивным (8 – вторая группа) показаниям. Все женщины включались в исследование добровольно, анонимно, подписывая информированное согласие на участие в исследовании и согласие на хранение биологического материала в лаборатории мозаики аутоиммунитета СПбГУ. Средний возраст женщин первой группы составил $30 \pm 4,5$ лет, 7 из них были курящими (36,8%). Пациентки включались в исследование и подвергались оперативному лечению с сентября 2018 по ноябрь 2019 года с последующим наблюдением до полугода. Показаниями к операции в данной группе служили микромастия, постлактационная инволюция молочных желез, эстетическая неудовлетворенность формой и объемом молочных желез. Во второй группе женщин, которые были оперированы по реконструктивным показаниям (29,6%), все были некурящими, средний возраст их составил $46 \pm 8,8$ лет, а 6 из 8 (75%) получали химиотерапию. У пациенток, включенных в исследование, был разный анамнез касательно силиконовых имплантатов. У 2 пациенток (7,4%) ранее были установлены силиконовые, наполняемые силиконом имплантаты по эстетическим соображениям; у 4 пациенток (14,8%) ранее были установлены силиконовые, наполняемые физиологическим раствором эспандеры как первый этап реконструкции молочной железы. То есть всего было прооперировано с установкой имплантатов до включения в исследование 6 пациенток (22,2%); 21 пациентка (77,8%) имплантатов на начало исследования не имела. Автором (Золотых Валерием Геннадьевичем) выполнены лично 80% всех оперативных вмешательств. Кроме того, он принимал непосредственное участие в подготовке к операциям, в послеоперационном ведении и данном исследовании у всех прооперированных пациенток.

За период наблюдения были выполнены: увеличение груди имплантатами, подтяжка молочных желез на имплантатах, замена имплантата на другой, отсроченная установка эспандера, замена эспандера на имплантат, укорочение субмаммарной складки, секторальная резекция молочной железы, санация периимплантатной полости с наложением вторичного шва, хирургическая обработка раны, наложение вторичного шва.

В контрольных точках – 0 (в день операции до вмешательства), через 3 и 6 месяцев после выполнялось взятие венозной крови для исследования количественного содержания аутоантител и гормонов. В сыворотке крови определяли аутоантитела (АТ): к модифицированному цитруллинированному виментину (СМV), кардиолипину классов IgG (CLIgG) и IgM (CLIgM), HEp-2-клеточным антигенам (HEp2), β -2-гликопротеину 1 (β 2GP1), тиреопероксидазе (ТРО), рецептору тиреотропного гормона (RTSH), тиреоглобулину (TG), аннексину V классов IgG (AVIgG) и IgM (AVIgM); а также измеряли концентрации ряда гормонов: пролактина (PL), тиреотропного гормона (TSH), трийодтиронина (Т3), тироксина (Т4). Измерения лабораторных параметров производили методом твердофазного иммуноферментного анализа в Ресурсном центре развития молекулярных и клеточных технологий Научного парка СПбГУ и лаборатории диагностики аутоиммунных болезней ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Статистическая обработка данных

Для описания категориальных переменных использовались абсолютные значения и доли от целого – n (%). Остальные параметры описывались средним и стандартным отклонением (M (σ)), медианой, 1-3 квартилями (Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)), минимальным и максимальным значением (min - max). Корреляционный анализ проводился при помощи коэффициента корреляции Спирмена (r -статистика). Сравнение данных с нормативными значениями проводилось одновыборочным критерием Манна–Уитни (W -статистика). Гипотеза равенства распределения частот проверялась точным критерием Фишера. Для оценки динамики титров гормонов и аутоантител с учетом специфики больных использовалась бета-регрессия со смешанными эффектами (библиотека GLMMadaptive) [22]. Бета-регрессия предназначена для моделирования данных, распределенных в интервале (0;1) [12]. Для трансформации исходных данных использовалась унитизация с нулевым минимумом [26]. В качестве случайного эффекта использовались уникальные номера больных. Для оценки зависимости бинарных переменных или упорядоченных величин от независимых переменных использовалась логистическая регрессия с упорядоченным выбором [9]. Коэффициенты регрессий представлялись либо в нестандартизированном виде, либо в виде разницы контраста (b (se)). Селекция моделей осуществлялась на основе информационных критериев Акаике (AIC) и Шварца (BIC). Модели характеризовались значениями логарифма максимального правдоподобия, девиансом и степенями свободы (Akaike's "An Information Criterion", AIC; log-

likelihood, LR; degrees of freedom, df), оценивали значимость модели (p). Результат тестирования представлялся в виде коэффициента регрессии и его стандартной ошибки либо в виде их разницы в случае попарного сравнения (b (se)). Характеристика случайного эффекта и дополнительного параметра включала в себя соответствующее значение с 95%-ным доверительным интервалом. В случае множественного тестирования гипотез использовалась поправка Беньямини–Хохберга для коррекции p-значений. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Все расчеты производились на языке программирования R v 3.6.1 [20].

Результаты

Среди включенных в исследование пациенток были лица с изначально присутствовавшими в сыворотке крови аутоантителами к 2-4 различным аутоантигенам, чаще всего — к бета-2-гликопротеину 1, аннексину V и аутоантигенам щитовидной железы. Поэтому серопозитивны-

ми считались только случаи превышения верхних границ интервала, свойственного здоровым индивидам, а для аутоантител к HER-2 — титры выше 1/160 [19]. Статистически оценивалась динамика каждого вида аутоантител на протяжении полугода (табл. 1).

Из таблицы видно, что в большинстве случаев титр аутоантител был стабильным или нарастающим. Статистически значимое увеличение числа серопозитивных пациенток после имплантации силикона было обнаружено для двух показателей аутоиммунитета: уровня аутоантител к модифицированному цитруллинированному виментину (ATMCV) и аутоантител к кардиолипину класса IgM (ATCLIGM). У одной пациентки возросла концентрация ATCLIGM выше нормы к 3 месяцу и далее в срок 6 месяцев после операции. Еще у 4 пациенток повысились концентрации ATCLIGM и ATMCV к 6 месяцам после операции. Таким образом, до операции ни у кого из пациенток не было обнаружено уровней аутоантител выше нормы; после операции в сроки 3 и 6 месяцев у 5

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА УРОВНЯ АУТОАНТИТЕЛ ДО И ПОСЛЕ СИЛИКОНОВОЙ МАММОПЛАСТИКИ

TABLE 1. DYNAMICS OF AUTOANTIBODY LEVELS BEFORE AND AFTER SILICONE MAMMOPLASTY

Аутоантитела к антигену Autoantibodies to antigen	День операции Day of surgery (n (%))	3 месяца после 3 months after (n (%))	6 месяцев после 6 months after (n (%))	p
Аннексин V IgG (AVIgG) Annexin V IgG	2 (7,4%)	1 (3,7%)	1 (3,7%)	1,000
Аннексин V IgM (AVIgM) Annexin V IgM	1 (3,7%)	1 (3,7%)	1 (3,7%)	1,000
Модифицированный цитруллинированный виментин (MCV) Modified citrullinated vimentin	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (7,4%)	0,048
Кардиолипин IgG (CLIGG) Cardiolipin IgG	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (3,7%)	0,366
Кардиолипин IgM (CLIGM) Cardiolipin IgM	0 (0,0%)	1 (3,7%)	3 (11,1%)	0,008
Ядерные антигены клеток HER-2 (HER2) Nuclear HER-2 cell antigen	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (3,7%)	0,366
β2-гликопротеин 1 (β2GP) β2-glycoprotein 1	3 (11,1%)	3 (11,1%)	3 (11,1%)	1,000
Рецептор ТТГ (RTSH) TSH receptor	1 (3,7%)	2 (7,4%)	1 (3,7%)	1,000
Тиреоглобулин (ТГ) Thyroglobulin	2 (7,4%)	2 (7,4%)	2 (7,4%)	1,000
Тиреопероксидаза (ТРО) Thyroid peroxidase	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	—

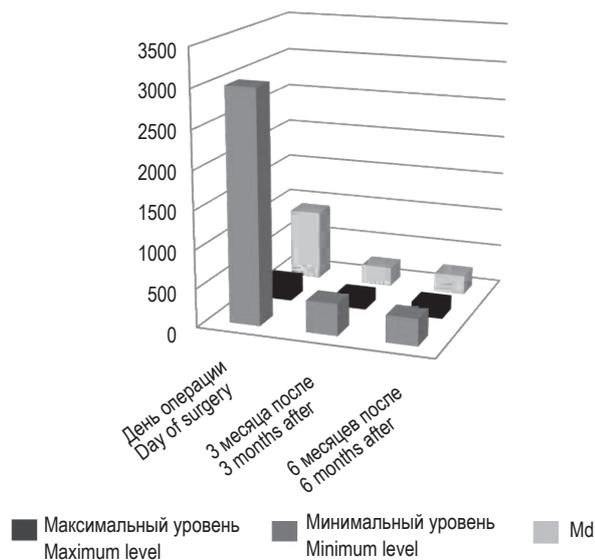


Диаграмма 1. Уровень пролактина у реципиентов силиконовой маммопластики

Diagram 1. Prolactin levels in recipients of silicone mammaplasty

пациенток из 27 (18,5%) был обнаружен подъем концентрации аутоантител выше нормы по 2 показателям. Изменения статистически значимы, как видно из последнего столбца таблицы, в обоих случаях $p < 0,05$.

На диаграмме 1 представлена динамика уровня пролактина сыворотки крови пациенток перед операцией и в сроки 3 и 6 месяцев после нее.

Пациентки перед маммопластикой имели значительно повышенный уровень пролактина – 908,8 мМЕ/л (249,0-3004,8). К 3 месяцу данный показатель понижался до нормы – 246,4 мМЕ/л (172,4-414,0) и оставался на том же уровне в 6 месяцев – 246,4 мМЕ/л (184,1-350,1). Референтные значения для их половозрастной группы составляют 108,78-557,13 мМЕ/л, при средних – от 183 до 404 мМЕ/л [5]; различия статистически значимы, $p < 0,05$.

Статистически значимой зависимости этих показателей от принадлежности пациенток к группам эстетической либо реконструктивной маммопластики отмечено не было, что видно из таблицы 2. В связи с этим при дальнейшей оценке спектра и динамики аутоиммунитета пациенток эстетической и реконструктивной подгруппы не разделяли.

Как видно из таблицы, статистически значимой разницы в колебаниях уровней аутоантител в динамике при сравнении между эстетической и реконструктивной группами установлено не было: в последнем столбце везде $p > 0,05$.

Динамика концентраций отдельных аутоиммунных и гормональных параметров на протя-

жении полугода после операций силиконовой маммопластики представлена ниже на рисунке 1 (аутоантитела) и рисунке 2 (гормоны). Везде отражены медианы величин (точками) и их 95% доверительный интервал (вертикальными линиями).

Из рисунка 1 видно, что уровни аутоантител к аннексину V класса IgG повышались к 3 месяцу и снижались затем за полгода ниже дооперационного уровня. Уровни аутоантител к аннексину V класса IgM, напротив, снижались к 3 месяцу и повышались за полгода выше дооперационного уровня, то есть изменялись обратно пропорционально по отношению к IgG той же аутоспецифичности. Уровень аутоантител к тиреопероксидазе снижался к 3-му месяцу и немного повышался к полугоду после маммопластики, оставаясь ниже дооперационного. Уровень аутоантител к тиреоглобулину снижался к 3-му месяцу, но через полгода становился выше дооперационного. Уровень аутоантител к бета-2-гликопротеиду I повышался к 3-му месяцу и далее, через 6 месяцев после силиконовой маммопластики становился еще выше дооперационного. Уровень аутоантител к кардиолипину класса IgG снижался к 3-му месяцу и повышался выше исходных значений к полугоду после операции силиконовой маммопластики. Уровень аутоантител к кардиолипину класса IgM снижался к 3-му месяцу и далее становился еще ниже в срок полгода после операции. Уровень аутоантител к модифицированному цитруллинированному виментину повышался к 3-му месяцу после операции и далее через полгода становился еще выше дооперационного уровня. Концентрации аутоантител к рецептору тиреотропного гормона (TSH) повышались к 3-му месяцу и снижались в течение полугода после вмешательства ниже дооперационного уровня, оставаясь в пределах физиологической нормы (см. рис. 1).

В целом через полгода после маммопластики было отмечено статистически значимое повышение уровней ATCL IgM и ATMCV, превысивших нормальные значения, тогда как уровень других аутоантител оставался в пределах нормальных значений.

Представленные графики наглядно демонстрируют, что уровень TSH повышался к 3-му месяцу после операции и далее снижался ниже дооперационного через полгода после нее. Уровень трийодтиронина (Т3) повышался к 3-му месяцу и далее к полугоду после операции становился еще выше, но не превышал норму. Уровень тироксина (Т4) снижался к 3-му месяцу после маммопластики, но повышался к полугоду выше дооперационного уровня, также не превышая норму. В целом уровни тиреоидных гормонов ко-

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА АУТОАНТИТЕЛ И ГОРМОНОВ В ГРУППАХ ОПЕРИРУЕМЫХ ПАЦИЕНТОК (ЭСТЕТИЧЕСКИЕ/РЕКОНСТРУКТИВНЫЕ ОПЕРАЦИИ)

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF AUTOANTIBODIES AND HORMONES IN GROUPS OF OPERATED PATIENTS (AESTHETIC/RECONSTRUCTIVE OPERATIONS)

Показатель Indicator	Константа Intercept (b(se), p)	3 месяца 3 months	6 месяцев 6 months	Эстетические vs реконструктивные показания Esthetic vs reconstruction (b(se), p)
TSH	-0,07 (0,83) p = 0,932	0,08 (0,51) p = 0,880	0,05 (0,52) p = 0,928	-0,59 (0,57) p = 0,301
T3	-1,77 (0,77) p = 0,022*	0,87 (0,52) p = 0,096	0,63 (0,53) p = 0,234	0,34 (0,51) p = 0,509
T4	-0,45 (0,69) p = 0,508	0,08 (0,42) p = 0,846	-0,08 (0,42) p = 0,858	-0,05 (0,48) p = 0,919
PL	0,01 (0,87) p = 0,990	-1,35 (0,58) p = 0,021*	-1,29 (0,58) p = 0,026*	-0,38 (0,48) p = 0,429
AT.TPO	-1,58 (0,73) p = 0,031*	-1,07 (0,53) p = 0,046*	-1,03 (0,52) p = 0,049*	-0,11 (0,39) p = 0,785
AT.TSH	-0,75 (0,88) p = 0,392	0,14 (0,54) p = 0,791	0,13 (0,54) p = 0,814	0,19 (0,49) p = 0,691
AT.RTSH	-2,45 (0,95) p = 0,010**	-0,16 (0,58) p = 0,777	0,89 (0,58) p = 0,126	-0,41 (0,72) p = 0,569
AT.B2GP	-2,88 (1,01) p = 0,004**	-0,28 (0,61) p = 0,641	-0,11 (0,64) p = 0,857	0,13 (0,84) p = 0,873
AT.AVIgG	-1,25 (0,77) p = 0,104	0,10 (0,48) p = 0,829	-0,27 (0,50) p = 0,593	-0,19 (0,55) p = 0,725
AT.AVIgM	-1,51 (1,03) p = 0,144	-1,70 (0,56) p = 0,002**	-1,07 (0,57) p = 0,062	0,76 (0,57) p = 0,180
AT.MCV	-2,51 (0,85) p = 0,003**	-0,51 (0,54) p = 0,344	0,08 (0,54) p = 0,887	0,60 (0,56) p = 0,284
AT.CLlgG	-2,58 (0,86) p = 0,003**	-0,24 (0,54) p = 0,648	0,62 (0,54) p = 0,253	0,80 (0,51) p = 0,116
AT.CLlgM	-0,57 (0,70) p = 0,414	-1,95 (0,48) p < 0,001***	-1,98 (0,49) p < 0,001***	0,44 (0,42) p = 0,289

Примечание. b – коэффициент регрессии, se – стандартная ошибка коэффициента, p – вероятность ошибки первого рода, * – p < 0,05, ** – p < 0,01, *** – p < 0,001.

Note. b, the regression coefficient; se, standard error of the coefficient; p, probability value; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

лебались незначительно в пределах нормальных величин на протяжении всего периода наблюдения. Статистически значимых колебаний обнаружено не было.

Интерес представляла взаимосвязь иммунных и эндокринных параметров, а также особенностей анамнеза реципиентов силиконовой маммопластики. Между этими характеристиками были установлены следующие корреляции, отраженные ниже на рисунке 3 (отрицательные – тонами голубого цвета, положительные – тонами розового, причем интенсивность окраски пропорциональна силе связи) (см. 3-ю стр. обложки).

В частности, была заметна положительная корреляция уровней аутоантител между собой.

В случае повышения уровня аутоантител к тиреоглобулину оказывался повышен и уровень аутоантител класса IgG к кардиолипину. В то же время в случае повышения уровня аутоантител к бета-2-гликопротеину оказывался повышен уровень аутоантител класса IgG к аннексину V и уровень аутоантител к модифицированному цитруллинированному виментину. В случае повышенного уровня аутоантител класса IgM к аннексину V оказывался снижен уровень аутоантител класса IgG к кардиолипину. В случае повышенного уровня аутоантител к тиреопероксидазе оказывался снижен уровень аутоантител к рецептору тиреотропного гормона, но был более длительным стаж курения. В случае повышения уровня

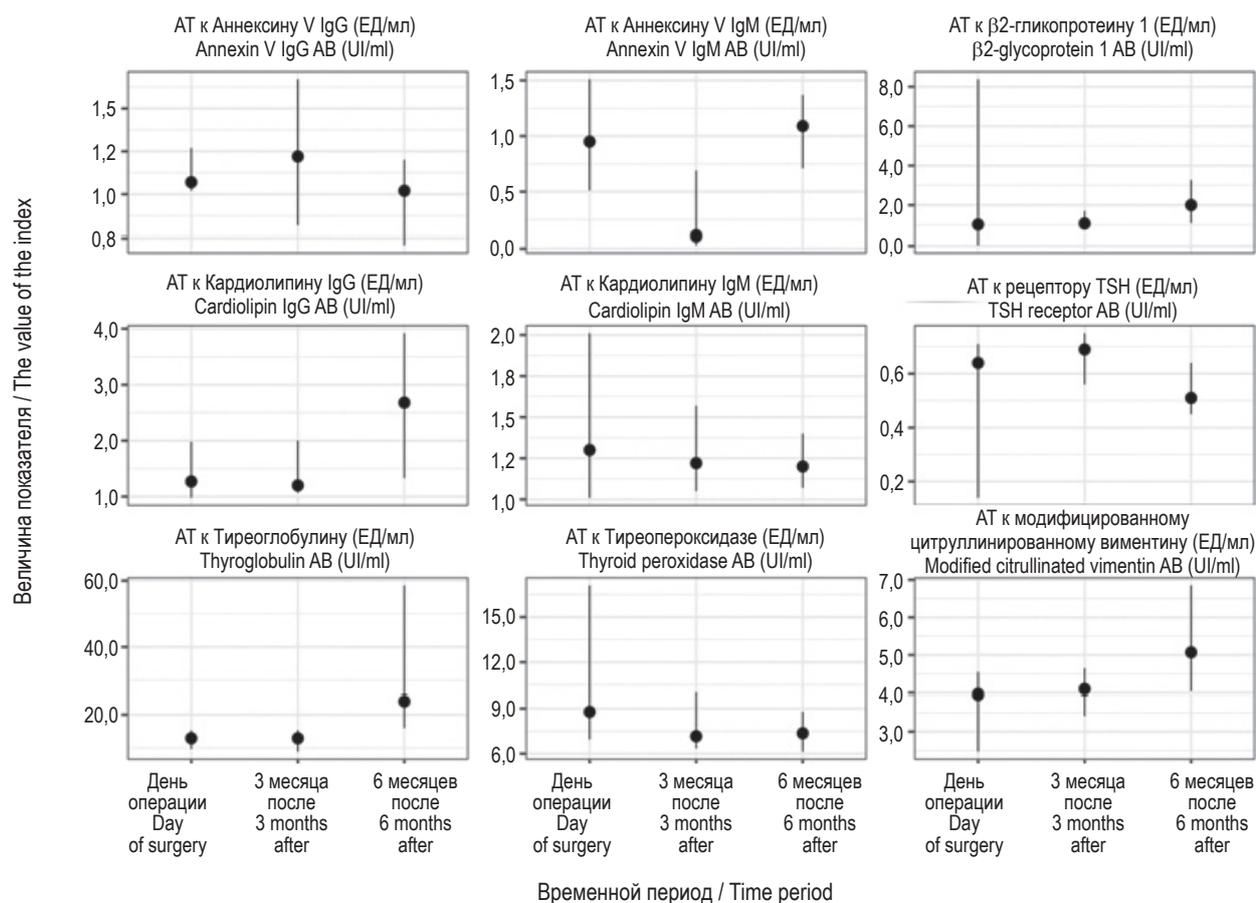


Рисунок 1. Динамика концентраций аутоантител до и в течение полугода после силиконовой маммопластики
Примечание. Точки – медианы величин, вертикальные линии – их 95%-ный доверительный интервал. 95% ДИ медианы считался бутстрепом. Разброс, вероятно, связан с малым количеством наблюдений.

Figure 1. Dynamics of autoantibody concentrations before and within six months after silicone mammaplasty
Note. Points are the medians of values, and vertical lines are their 95% confidence interval. 95% of the median WAS considered a bootstrap. The variation is probably due to a small number of observations.

пролактина оказывался снижен уровень аутоантител к кардиолипину класса IgM. Наконец, в случае повышения уровня тироксина оказывались снижены уровни аутоантител к аннексину IgM и модифицированному цитруллинированному виментину. В случае повышения уровня Т3 оказывался снижен уровень аутоантител к кардиолипину М. В случае повышения уровня тиреотропного гормона оказывался повышен уровень аутоантител к тиреопероксидазе. На рисунке 3 (см. 3-ю стр. обложки) показаны только статистически значимые результаты.

Обсуждение

По данным Shelly S. и соавт., пролактин регулирует состояние молочных желез, а также аутоиммунитет [24], что послужило основной нашей гипотезы о возможной послеоперационной ги-

перпролактинемии и ее роли в регуляции аутоиммунитета при силиконовом протезировании.

Однако результаты проведенного нами исследования продемонстрировали гиперпролактинемию около 908,8 мМЕ/л у большинства пациенток перед маммопластикой, в то время как через 3 и 6 месяцев после операции пролактин у них снижался до нормы – 246,4 мМЕ/л (рис. 2).

Наши данные по послеоперационному уровню пролактина согласуются данными N.D. El-Hassan [13] и Е.А. Смирновой [4], которые в похожих работах получили нормальный уровень пролактина после операции. N.D. El-Hassan и соавт., при исследовании 11 пациенток от 25 до 43 лет, через 3 месяца после операции получили нормальный уровень пролактина (11,3 нг/мл или 240,4 мМЕ/л), что полностью соответствует нашим цифрам в 3 месяца (246,4 мМЕ/л) [13]. Е.А. Смирнова и соавт., изучая 150 пациенток-

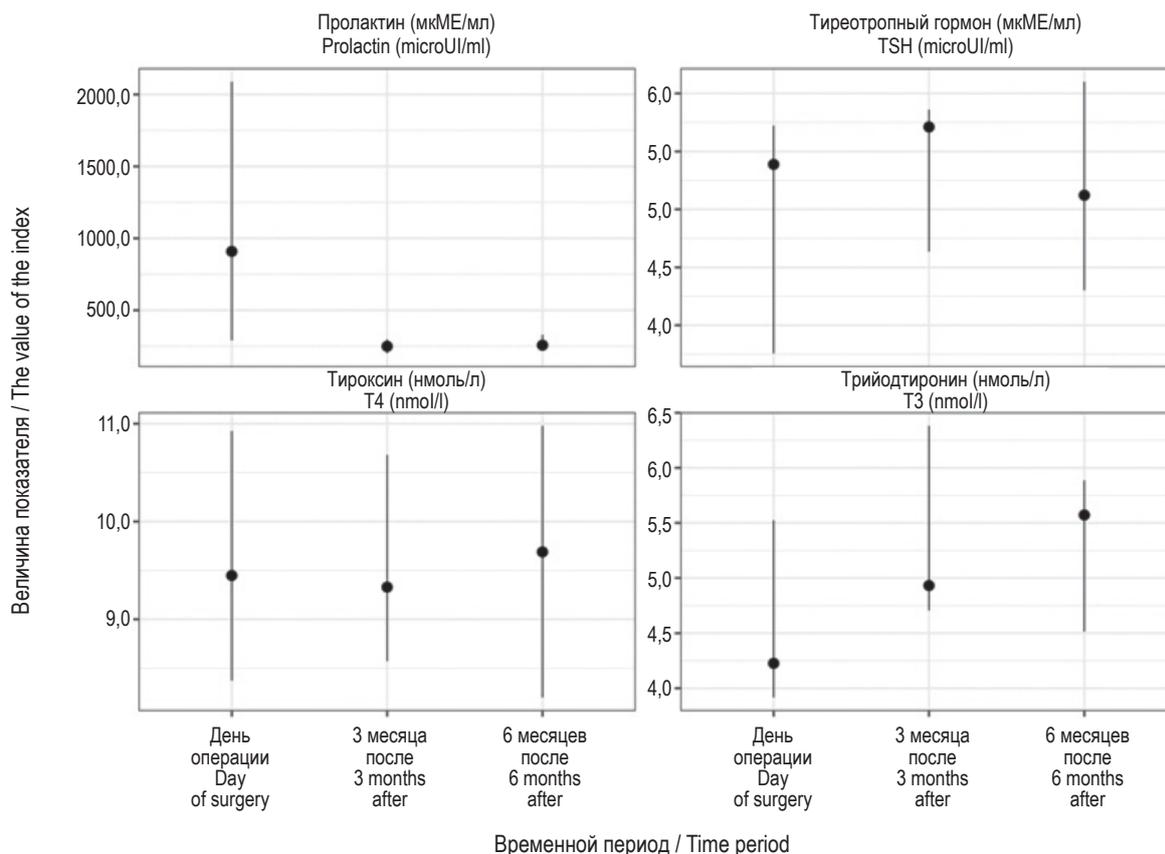


Рисунок 2. Динамика концентраций пролактина и тиреоидных гормонов до и после силиконовой маммопластики
Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Dynamics of prolactin and thyroid hormone concentrations before and after silicone mammaplasty
Note. As for Figure 1.

реципиенток эстетической маммопластики со средним возрастом $37,6 \pm 6,2$ года получили средний уровень пролактина после маммопластики 322 ± 94 мМЕ/л, что также является нормой.

В то же время нашим данным по предоперационному уровню пролактина противоречат данные тех же N.D. El-Hassan и Е.А. Смирновой, а также данные J.E. Brooks и соавт. [7]. N.E. El-Hassan и соавт. получили нормальные уровни пролактина до операции (17,5 нг/мл или 372,3 мМЕ/л) в схожих исследованиях. Е.А. Смирнова и соавт. получили средний уровень пролактина до маммопластики 453 ± 199 мМЕ/л, что является также нормой. Brooks и соавт., на примере 48 женщин (средний возраст 47,4 года), не получили повышения пролактина перед плановыми операциями (208 мМЕ/л), а также и связи балльной оценки уровня стресса по опроснику с уровнем пролактина крови.

В нашем случае причиной предоперационной гиперпролактинемии у пациенток силиконовой маммопластики, которые в течение значительно-

го времени были озабочены видом и состоянием своих молочных желез, стремясь их восстановить после утраты или увеличить, мы видим психогенный фактор и стресс в связи с процедурами и предоперационным осмотром области операции (фотографирование, разметка, пальпация). Существование же феномена психогенной (стрессогенной) гиперпролактинемии было доказано ранее [6, 13]. Кроме того, мы не получили корреляционных связей между уровнем пролактина после операции и уровнями аутоантител, кроме отрицательной связи с уровнем аутоантител к кардиолипину М. Таким образом, и в нашем исследовании, и в исследованиях других авторов наличие силиконового имплантата молочных желез не стимулировало у пациенток выработки пролактина. Это значит, что наша рабочая гипотеза о возможной стимуляции уровня пролактина посредством силиконового имплантата с дальнейшим пролактиновым влиянием на уровни аутоантител в ходе исследования на данной выборке пациентов не подтвердилась.

Что касается динамики уровней аутоантител, то мы обнаружили статистически значимое повышение уровней АТСLIgM и АТМСV у 18,5% пациенток после операции. Учитывая отсутствие в анамнезе и катанезе возможных причин для такого повышения, кроме установки силиконовых имплантатов, это может свидетельствовать об аутоиммунном (адьювантоподобном) действии силикона у части пациенток в нашем исследовании, по крайней мере – в сроки наблюдения до полугода. Наблюдаемые нами изменения (см. табл. 1) в целом согласуются с данными С.А. Вруннер и соавт. [8]. Указанные авторы наблюдали 236 пациенток после силиконовых эстетических (средний возраст $29,5 \pm 7,9$ лет) и реконструктивных маммопластик (средний возраст $42,9 \pm 8$ лет). Они получили статистически значимое превышение нормы аутоантител к тиреоглобулину у 28% пациенток. В нашем исследовании их уровень вырос к 6 месяцам, но не превысил норму ни в одном случае. Также, по их данным, уровень антимицросомальных аутоантител (антител к тиропероксидазе) у 14,2% пациенток был выше нормы. У нас же их значения находились ниже уровня нормы до операции и снизились в динамике к 6 месяцам. Такую разницу в полученных данных мы объясняем более ранними сроками контроля в нашем исследовании – 3 и 6 месяцев, а также отсутствием у наших пациенток фиброзной капсулярной контрактуры вокруг имплантатов. У С.А. Вруннер и соавт. сроки наблюдения составили в подавляющем большинстве 1 год и более; а все пациентки, включенные в исследование, имели фиброзную контрактуру периимплатантной капсулы разной степени тяжести. Тем не менее по результатам нашего исследования и данным других авторов, именно уровни аутоантител пациенток до и после пластики молочной железы силиконовыми имплантатами могут служить признаком активизации аутоиммунных процессов в сроки от 3-х месяцев после силиконовой маммопластики.

Повышение аутоиммунитета к различным антигенам-мишеням после маммопластики, по

нашим данным, статистически значимо положительно коррелировало между собой. Это может объясняться зависимостью от общего, не связанного с антигенной специфичностью силикона, воздействия, стимулирующего иммунные ответы (например, антиген-неспецифичного адьювантного).

Отрицательную корреляцию уровня тиреоидных гормонов и титра некоторых аутоантител можно связать с известным свойством тиреоидных гормонов ускорять апоптоз лимфоидных клонов и препятствовать продукции аутоантител, причем не только антитиреоидных, но и иной специфичности [1, 18].

В нашем исследовании уровень аутоантител к тиропероксидазе положительно коррелировал с повышением концентраций ТТГ. Это можно объяснить компенсаторным действием последнего. Такое влияние ТТГ на АТТРО описано для аутоиммунных тиропатий [21].

Заключение

Таким образом, на имеющемся клиническом материале мы не подтвердили рабочую гипотезу. Наличие силиконового имплантата молочных желез не стимулировало у пациенток выработки пролактина: перед эстетическими и реконструктивными маммопластическими операциями имелась гиперпролактинемия, которая купировалась самостоятельно впоследствии.

Изменения в спектре и напряженности аутоиммунных реакций после силиконовой маммопластики, при неотягощенном анамнезе и катанезе пациенток, нельзя объяснить гиперпролактинемией.

Признаками активации аутоиммунных процессов после имплантации силикона служат повышающиеся уровни некоторых аутоантител, по крайней мере – в сроки от 3 месяцев после операции.

Исследование этого вопроса в более поздние сроки после операций и на большей выборке пациенток будет продолжено.

Список литературы / References

1. Баранов Д.З., Строев Ю.И., Чурилов Л.П. Состояние тромбоцитарного звена гемостаза у больных аутоиммунным тиреоидитом с гипотирозом // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения, 2015. Т. 10, № 2. С. 542-551. [Baranov D.Z., Stroev Yu.I., Churilov L.P. Status of the the platelet link of hemostasis in patients with autoimmune thyroiditis and hypothyroidism. *Zdorovye – osnova chelovecheskogo potentsiala: problemy i puti ikh resheniya* = Health is the Basis of Human Potential: Problems and Ways to Solve Them, 2015, Vol. 10, no. 2, pp. 542-551. (In Russ.)]
2. Золотых В.Г., Акимов О.А., Петрачков А.О., Хлебникова Е.Ю., Чурилов Л.П., Яблонский П.К. Влияет ли силиконовое протезирование на иммунную систему реципиентов? // Клиническая патофизиология, 2018. № 2. С. 16-21. [Zolotykh V.G., Akimov O.A., Petrachkov A.O., Khlebnikova E.Yu., Churilov L.P.

Yablonsky P.K. Do silicone prosthetics alter the immune system of their recipients? *Klinicheskaya patofiziologiya = Clinical Pathophysiology*, 2018, no. 2, pp. 16-21. (In Russ.)

3. Руководство по аутоиммунным заболеваниям для врачей общей практики. Под ред. Шенфельда И., Мерони П.Л., Чурилова Л.П. СПб: ЭЛБИ-Медкнига, 2017. 416 с. [Guide to autoimmune diseases for General practitioners. Eds: Shoenfeld Y., Meroni P.L., Churilov L.P.]. St. Petersburg: ELBI-Medkniga Publishers, 2017. 416 p.

4. Смирнова Е.А., Дорофеев А.В., Голубков Н.А., Нудельман С.В. Алгоритм обследования пациентов перед маммопластикой // Уральский медицинский журнал, 2012. Т. 96, № 4. С. 74-77. [Smirnova E.A., Dorofeev A.V., Golubkov N.A., Nudelman S.V. Algorithm of preoperative examination of breast surgery patients. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2012, Vol. 96, no. 4, pp. 74-77. (In Russ.)]

5. Хижняк О.О., Микитюк М.Р., Гогитидзе Т.Г. Возрастные нормы содержания пролактина в сыворотке крови здоровых добровольцев // Проблеми ендокринної патології, 2015. № 2. С. 76-84. [Khyzhnyak O.O., Mikityk M.R., Gogitidze T.G. Age norms of the serum prolactin level in blood of healthy volunteers. *Problemy endokrynnoyi patolohiyi = Problems of Endocrine Pathology*, 2015, no. 2, pp. 76-84. (In Russ.)]

6. Assies J., Vingerhoets A.J.J.M., Poppelaars K. Psychosocial aspects of hyperprolactinemia. *Psychoneuroendocrinology*, 1992, Vol. 17, no. 6, pp. 673-679.

7. Brooks J.E., Herbert M., Walder C.P., Selby C., Jeffcoate W.J. Prolactin and stress: some endocrine correlates of pre-operative anxiety. *Clin. Endocrinol.*, 1986, Vol. 24, pp. 653-656.

8. Brunner C.A., Feller A., Gröner R., Dees E., Biefel K., Biemer E. Increase of immunologically relevant parameters in correlation with Baker classification in breast implant recipients. *Ann. Plast. Surg.*, 1996, Vol. 36, no. 5, pp. 512-521.

9. Christensen R.H.B. Ordinal – regression models for ordinal data / R.H.B. Christensen. – R package version 2019.4-25.

10. Churilov L.P., Sobolevskaia P.A., Stroeve Y.I. Thyroid gland and brain: Enigma of Hashimoto's encephalopathy. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2019, Vol. 33, no. 6, 101364. doi: 10.1016/j.beem.2019.101364.

11. Coroneos C.J., Selber J.C., Offodile A.C., Butler C.E., Clemens M.W. US FDA Breast Implant Postapproval Studies. Long-term outcomes in 99,993 patients. *Ann. Surg.*, 2019, Vol. 269, no. 1, pp. 30-36.

12. Cribari-Neto F., Zeileis A. Beta Regression in R. *J. Statistic. Softw.*, 2010, Vol. 34, no. 2, pp. 1-24.

13. El-Hassan N.D., Zaworski R.E., Castro A., LeMarie W.J. Serum prolactin levels following augmentation mammoplasty. *Plast. Reconstr. Surg.*, 1981, Vol. 68, no. 2, pp. 215-217.

14. Hennekens C.H., Lee I.M., Cook N.R., Hebert P.R., Karlson E.W., LaMotte F. Self-reported breast implants and connective-tissue diseases in female health professionals. A retrospective cohort study. *JAMA*, 1996, Vol. 275, pp. 616-621.

15. ISAPSE. International Survey on Aesthetic/Cosmetic Procedures. International Society for Aesthetic Plastic Surgery. Available at: <https://www.isaps.org/wp-content/uploads/2019/12/ISAPS-Global-Survey-Results-2018-new.pdf> [accessed: 11.03.2020].

16. Kessler D.A. The basis of the FDA's decision on breast implants. *N. Engl. J. Med.*, 1992, Vol. 326, pp. 1713-1715.

17. Medical Device Reports of Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma. Content current as of: 07/24/2019. Available at: <https://www.fda.gov/medical-devices/breast-implants/medical-device-reports-breast-implant-associated-anaplastic-large-cell-lymphoma> [accessed: 11.03.2020].

18. Mihara S., Suzuki N., Wakisaka S., Suzuki S., Sekita N., Yamamoto S., Saito N., Hoshino T., Sakane T. Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999, Vol. 84, no. 4, pp. 1378-1385.

19. Poletaev A.B. The immunological homunculus (immunculus) in normal state and pathology. *Biochemistry (Moscow)*, 2002, Vol. 67, no. 5, pp. 600-608.

20. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019. Available at: <https://www.R-project.org/> (Accessed: 20.01.2020).

21. Ragusa F., Fallahi P., Elia G., Gonnella D., Paparo S.R., Giusti C., Churilov L.P., Ferrari S.M., Antonelli A. Hashimoto's Thyroiditis: epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2019, Vol. 33, no. 6, 101367. doi: 10.1016/j.beem.2019.101367.

22. Rizopoulos D. GLMMadaptive: Generalized Linear Mixed Models using Adaptive Gaussian Quadrature. GLMMadaptive. 2019. Available at: <https://github.com/drizopoulos/GLMMadaptive> [accessed: 11.03.2020].

23. Sanchez-Guerrero J., Colditz G.A., Karlson E.W., Hunter D.J., Speizer F.E., Liang M.H. Silicone breast implants and the risk of connective tissue diseases and symptoms. *N. Engl. J. Med.*, 1995, Vol. 332, no. 25, pp. 1666-1670.

24. Shelly S., Boaz M., Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2012, Vol. 11, no. 6, pp. A465-A470.

25. Shoenfeld Y., Agmon-Levin N. 'ASIA' – autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J. Autoimmun.*, 2011, Vol. 36, no. 1, pp. 4-8.

26. Walesiak M. Uogólniona miara odległości GDM w statystycznej analizie wielowymiarowej z wykorzystaniem programu R. Walesiak M., Wrocław. Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego, 2016, 168 s.

27. Watad A., Rosenberg V., Tiosano S., Cohen Tervaert J.W., Yavne Y., Shoenfeld Y., Shalev V., Chodick G., Amital H. Silicone breast implants and the risk of autoimmune/rheumatic disorders: a real-world analysis. *Int. J. Epidemiol.*, 2018, Vol. 47, no. 6, pp. 1846-1854.

28. Zolotykh V.G., Kim A.Y., Shoenfeld Y., Churilov L.P. Galactorrhoea following silicone breast implant placement. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2019, Vol. 21, no. 8, p. 523.

Авторы:

Золотых В.Г. — врач-хирург, младший научный сотрудник лаборатории мозаики аутоиммунитета, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Гвоздецкий А.Н. — врач-психиатр, аспирант кафедры психиатрии и наркологии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Ким А.Я. — врач-онколог, маммолог, ООО «СМ-клиника», Москва, Россия

Лапин С.В. — к.м.н., заведующий лабораторией аутоиммунной диагностики ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Михайлова Л.Р. — магистр психологии, инженер лаборатории аутоиммунной диагностики ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Старовойтова Е.М. — студентка медицинского факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Федоткина Т.В. — к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории мозаики аутоиммунитета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Чурилов Л.П. — к.м.н., доцент, заведующий кафедрой патологии, заместитель руководителя лаборатории мозаики аутоиммунитета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; ведущий научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Шенфельд Йегуда — доктор медицины, академик НАН Израиля, член Королевского колледжа врачей, магистр клинических исследований, почетный профессор медицины Тель-Авивского университета, руководитель Центра аутоиммунных заболеваний имени П. Заблудовича, Медицинский центр Шеба, Тель-Хашомер, Израиль; ведущий ученый руководитель Лаборатории мозаики аутоиммунитета, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Яблонский П.К. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой госпитальной хирургии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; директор ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Zolotykh V.G., Aesthetic Surgeon, Junior Research Associate, Laboratory of the Mosaic of Autoimmunity, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Gvozdetzky A.N., Psychiatrist, Postgraduate Student, Department of Psychiatry and Addiction Diseases, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Kim A.Ya., Clinical Oncologist, Mammologist, LLC "CM Clinic", Moscow, Russian Federation

Lapin S.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Autoimmune Diagnostics, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Mikhailova L.R., M.S. (Psychology), Engineer, Laboratory of Autoimmune Diagnostics, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Starovoitova E.M., Student, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Fedotkina T.V., PhD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of the Mosaic of Autoimmunity, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Churilov L.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pathology, Deputy Chief, Laboratory of the Mosaic of Autoimmunity, St. Petersburg State University; Leading Research Associate, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Shoenfeld Yehuda, MD, Full Member of IASH, FRCP, MACR, Professor (Emer.) of Medicine in Tel-Aviv University, Head, P. Zabudowicz Center for Autoimmune Diseases, Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Israel; Head, Leading Scientist, Laboratory of the Mosaic of Autoimmunity, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Yablonsky P.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Hospital Surgery, St. Petersburg State University; Director, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

ДИНАМИКА УРОВНЯ АНТИСПЕРМАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ У ПОДРОСТКОВ С ЛЕВОСТОРОННИМ ВАРИКОЦЕЛЕ

Пичугова С.В.^{1,2}, Рыбина И.В.^{1,2}, Бейкин Я.Б.^{1,2}

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

² МАУ «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Варикоцеле представляет собой варикозное расширение вен семенного канатика и относится к одной из самых распространенных патологий, диагностируемых в детском и подростковом возрасте, имеющей высокую степень риска исхода в infertility. Варикоцеле рассматривается в качестве кофактора развития иммунологической формы бесплодия в результате повреждения гематотестискулярного барьера на фоне венозного стаза, гипертермии, ишемии тестикулярной ткани. Цель исследования – определение уровня антиспермальных антител (АСАТ) в сыворотке крови и эякуляте у подростков с левосторонним варикоцеле, оценка динамики уровня АСАТ в сыворотке крови в различных возрастных группах в послеоперационном периоде, в зависимости от степени варикоцеле. Подросткам с левосторонним варикоцеле и без варикоцеле проводилось ежегодное определение уровня АСАТ в сыворотке крови за период от 14 до 17 лет, определение титра АСАТ в семенной жидкости в возрасте 17 лет. Сравнивали показатели уровня АСАТ в сыворотке крови в динамике между основной группой и группой сравнения, между группами по степеням варикоцеле, между группами до и после оперативной коррекции варикоцеле.

Не установлено повышения уровня АСАТ выше допустимых значений ни у одного обследуемого. В динамике уровня АСАТ в сыворотке крови выявлено нарастание показателей в возрасте 15–16 лет у подростков обеих групп с тенденцией к снижению в группе сравнения к 17-летнему возрасту и без тенденции к снижению в основной группе. Не обнаружено достоверно значимых различий в уровне АСАТ в сыворотке крови в зависимости от степени варикоцеле, от давности варикоцелэктомии.

Ключевые слова: варикоцеле, подростки, антиспермальные антитела, бесплодие, варикоцелэктомия

DYNAMICS OF SPERM ANTIBODY LEVELS IN ADOLESCENTS WITH LEFT-SIDED VARICOCELE

Pichugova S.V.^{a, b}, Rybina I.V.^{a, b}, Beikin Ya.B.^{a, b}

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

^b Clinical Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Varicocele means a varicose vein of the spermatic cord, being among the most common disorders diagnosed in childhood and adolescence, which suggests a high risk for infertility. Varicocele is considered an additional factor for immune-dependent infertility which results from damaged hemato-testicular barrier due to venous blood stasis, hyperthermia, testicular ischemia. Our objective was to determine levels of the sperm

Адрес для переписки:

Пичугова Светлана Владимировна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (905) 802-15-39.
Факс: 8 (343) 204-71-57.
E-mail: ekb-lem@mail.ru

Address for correspondence:

Pichugova Svetlana V.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian
Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,
Pervomayskaya str., 106.
Phone: 7 (905) 802-15-39.
Fax: 7 (343) 204-71-57.
E-mail: ekb-lem@mail.ru

Образец цитирования:

С.В. Пичугова, И.В. Рыбина, Я.Б. Бейкин «Динамика
уровня антиспермальных антител у подростков
с левосторонним варикоцеле» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 969–976.
doi: 10.15789/1563-0625-DOS-1873

© Пичугова С.В. и соавт., 2020

For citation:

S.V. Pichugova, I.V. Rybina, Ya.B. Beikin “Dynamics of
sperm antibody levels in adolescents with left-sided varicocele”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 5, pp. 969–976.
doi: 10.15789/1563-0625-DOS-1873

DOI: 10.15789/1563-0625-DOS-1873

antibodies in serum and ejaculate in adolescents with left-sided varicocele, in order to assess the changing levels of sperm antibodies in blood serum at different ages during the postoperative period, depending on the degree of varicocele. For adolescents with left-sided varicocele and without varicocele, the serum levels of sperm antibodies were determined annually at the age of 14 to 17 years, as well as registration of sperm antibodies titer in seminal fluid at the age of 17 years. The levels of sperm antibodies in blood serum were traced in dynamics for the main group and comparison group, also comparing the groups with different degrees of varicocele, like as the patients before and after surgical varicocele correction. We did not reveal increased levels of the sperm antibodies over reference values in any subject under study. The level changes of sperm antibodies in serum showed an increase in these indexes at the age of 15-16 years in adolescents of both groups with a trend for a decrease in the comparison group by 17 years of age, however, without such tendency in the main group. No significant differences were found in the levels of sperm antibodies in blood serum depending on the degree of varicocele, and on the time after varicocelectomy.

Keywords: varicocele, adolescents, sperm antibodies, infertility, varicocelectomy

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

Введение

Приоритетной государственной задачей во всем мире является охрана репродуктивного здоровья населения [5]. В России отмечается особая актуальность этой задачи, связанная с процессом депопуляции, обусловленной демографическим кризисом, наметившимся в нашей стране в последние годы [9, 11]. На фоне сложившейся неблагоприятной тенденции особенно важным является сохранение репродуктивного здоровья мальчиков и подростков. К одной из самых распространенных патологий, диагностируемых в детском и подростковом возрасте, относится варикоцеле [3, 4]. Согласно данным ведущих российских урологов-андрологов, количество мальчиков, перенесших оперативное вмешательство на органах репродуктивной системы, увеличивается с каждым годом [4]. Варикоцеле представляет собой варикозное расширение вен семенного канатика, и его частота встречаемости среди лиц мужского пола составляет 15-40%, что делает его самой распространенной андрологической патологией [7, 13, 16]. Частота встречаемости левостороннего варикоцеле составляет 77-92%, в то время как правостороннее варикоцеле диагностируется в 1-8% случаев, а двустороннее – в 2,6-38% случаев [2]. Это обусловлено анатомическими различиями в дренажной системе яичек, поскольку правая яичковая вена впадает в vena cava inferior, а левая – в левую почечную вену [21]. Повышение гидростатического давления в левой тестикулярной вене обусловлено компрессией почечной вены слева аортой и верхней мезентериальной артерией – аорто-мезентериальный пинцет (nutcracker effect), что и приводит к варикозному расширению вен семенного канатика слева [26]. Являясь агрессивной формой орхопатии, варикоцеле в подростковом возрасте имеет высокую степень риска исхода в infertility [6, 8]. Рассматривается несколько теорий, приводящих к развитию бесплодия

при варикоцеле, такие как наличие ретроградного кровотока венозной крови от почечной вены к яичку с последующим ишемическим поражением его паренхимы, рефлюкс биологически активных веществ (катехоламинов) из почек и надпочечников в гонады, повышение температуры в яичке, венозная гипертензия, развитие оксидантного стресса, гипоандрогения [6, 12, 16, 17]. Одним из механизмов infertility при варикоцеле рассматривается развитие иммунологической формы бесплодия, которая связана с нарушением целостности гематотестикулярного барьера и образованием антиспермальных антител (АСАТ), определяемых в сыворотке крови и эякуляте у мужчин [10, 24, 25]. АСАТ часто выявляются у пациентов с варикоцеле, по данным разных источников в 25-40% случаев [12, 16, 17, 18]. Известно, что варикоцеле не является непосредственной причиной аутоиммунной реакции против сперматозоидов, а выступает в качестве кофактора, повышающего риск развития иммунологического бесплодия [16, 17]. Повреждение гематотестикулярного барьера при варикоцеле обусловлено гипертермией, ишемией тестикулярной ткани, приводящих к изменениям обменных процессов в яичке, нарушению транспорта воды, лактата и других веществ в клетках Сертоли [13, 14, 17]. Кроме того, при варикоцеле установлено снижение экспрессии Е-кадгерина и альфа-катенина в местах соединения клеток Сертоли, что может также привести к повышению проницаемости гематотестикулярного барьера и выработке АСАТ [13]. АСАТ вызывают агглютинацию сперматозоидов, фиксируясь на их поверхности, снижают их подвижность, ухудшают проникновение сперматозоидов в цервикальную слизь, нарушают акросомальную реакцию, препятствуют оплодотворению яйцеклетки [10, 12, 19, 27, 28, 30].

Логично предположить, что более тяжелая степень варикоцеле приведет к более выраженным изменениям тестикулярной ткани и, следовательно, к более высокой вероятности развития иммунологической формы бесплодия.

Дискуссионным остается вопрос о влиянии хирургической коррекции варикоцеле на уровень АСАТ. Ряд авторов считают, что улучшение гемодинамики яичка в результате операции должно привести к уменьшению уровня АСАТ [12, 20]. Другие авторы придерживаются мнения, что операция на репродуктивных органах либо никак не влияет на уровень АСАТ, либо сама может спровоцировать развитие аутоиммунных реакций против сперматозоидов [4, 11, 15, 23, 29].

Поэтому у подростков с варикоцеле в качестве одного из прогностических критериев возможного бесплодия важно не только определение уровня АСАТ в сыворотке крови и эякуляте, но и оценка их уровня в динамике в послеоперационном периоде в зависимости от степени варикоцеле.

Цель исследования — определение уровня АСАТ в сыворотке крови и эякуляте у подростков с левосторонним варикоцеле, оценка динамики уровня АСАТ в сыворотке крови в различных возрастных группах в послеоперационном периоде, в зависимости от степени варикоцеле.

Материалы и методы

Обследовано 92 подростка с левосторонним варикоцеле. Пациентам ежегодно проводилось определение уровня АСАТ в сыворотке крови за период от 14 лет до достижения ими 17 лет (4-кратно). В возрасте 17 лет проводилось определение уровня АСАТ в эякуляте. Все пациенты и их законные представители дали информированное согласие на участие в исследовании.

По степени варикоцеле пациенты были разделены на две группы по 46 человек с II и III степенью соответственно.

Определение уровня АСАТ до оперативного вмешательства с последующей варикоцелэктомией и динамическим наблюдением было выполнено 43 пациентам. У остальных 49 подростков хирургическое вмешательство по коррекции варикоцеле было в анамнезе за 1-2 года на момент начала обследования.

Группу сравнения в количестве 20 человек составили подростки, у которых было подтверждено отсутствие варикоцеле и других заболеваний репродуктивных органов. Обследование было проведено по аналогичной схеме.

Определение АСАТ в сыворотке крови проводилось методом количественного ИФА на сертифицированных диагностических наборах фирмы Bioserv, имеющих регистрационное удостоверение Министерства здравоохранения Российской Федерации и разрешенных для использования в медицинских целях. В исследовании определялась концентрация антител в МЕ/мл, положительным (диагностически значимым) считался результат с концентрацией более 60 МЕ/мл. Уровень АСАТ менее 60 МЕ/мл оценивался как

нормальный. Оценка результатов исследования выполнена на фотометре "Multiscan Plus" фирмы Labsystems. Инструкция к набору не содержит информации на возможность неспецифического связывания реагентов с какими-либо компонентами, кроме антител к антигенам сперматозоидов.

Антитела в семенной жидкости определялись с помощью метода латексной агглютинации. Данное исследование выполнялось на диагностических наборах фирмы "Bioserv". В исследовании семенная плазма, полученная путем центрифугирования эякулята, разведенная буфером для разведения образцов, смешивалась с суспензией латексных частиц. В случае наличия специфических антител в образце семенной плазмы, направленных против спермальных антигенов, латексные частицы, сорбированные антигеном, агглютинировали в течение 1-2 минут. Положительным считался тест на присутствие АСАТ, если агглютинация присутствовала при разведении образца, начиная с 1:100. Проводилась визуальная оценка теста.

Статистический анализ результатов исследований проведен с использованием компьютерной программы Microsoft Excel XP с предварительной оценкой нормальности распределения. Вычислялись: среднее арифметическое значение (M), среднеквадратичное отклонение, средняя квадратичная ошибка среднего значения (m). При оценке достоверности различий (p) между признаками с нормальным распределением применялся коэффициент Стьюдента (t). Для установления корреляционных взаимосвязей ряда показателей использовался линейный коэффициент корреляции Пирсона (r). Различия результатов считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Анализ качественных признаков проводили с помощью критерия χ^2 .

Результаты

У пациентов основной группы и группы сравнения при сопоставлении уровня АСАТ в динамике по возрастам были получены следующие данные (табл. 1).

При сравнении показателей уровня АСАТ между пациентами основной группы и группы сравнения было установлено, что у пациентов группы сравнения в возрасте 15 лет уровень АСАТ достоверно выше, чем у пациентов 15 лет при варикоцеле. Сравнивая динамику уровня АСАТ внутри каждой группы, было выявлено, что в основной группе статистически значимо уровень АСАТ увеличивается у подростков в 15 и 16 лет, а в группе сравнения такое увеличение зафиксировано только в 15 лет.

Далее был проведен анализ динамики уровня АСАТ в зависимости от степени варикоцеле. Результаты представлены в таблице 2.

Статистически значимых различий в уровне АСАТ у пациентов в одинаковых возрастных группах при II и III степенях варикоцеле не установлено.

При сравнении уровней АСАТ в зависимости от степени варикоцеле у пациентов в основной группе с показателями уровня АСАТ пациентов группы сравнения достоверно значимых различий не выявлено.

Поскольку группе подростков в количестве 43 человек первичное определение уровня АСАТ в сыворотке крови было проведено до оперативной коррекции варикоцеле, было предложено оценить эти результаты в качестве маркера инициации оперативным вмешательством аутоиммунных реакций, обусловленных возможным повреждением гематотестикулярного барьера. У остальных 49 подростков, у которых операция была в анамнезе за 1-2 года до начала исследования, была оценена динамика уровня АСАТ. Условно пациенты были разделены на группу «до операции» и группу «после операции». Показатели уровня АСАТ условных групп в зависимости от давности оперативного вмешательства были сопоставлены между собой и с показателями уровня АСАТ пациентов группы сравнения. Результаты представлены в таблице 3.

Не установлено статистически значимых различий в уровне АСАТ у пациентов в возрасте 14 лет, которым еще не проведена была оперативная коррекция варикоцеле, и у пациентов, перенес-

ших варикоцелэктомии. В дальнейшем послеоперационном периоде также не отмечено достоверно значимых различий в уровне АСАТ между группами одного возраста.

При проведении сравнения уровней АСАТ у пациентов основной группы в зависимости от давности проведения варикоцелэктомии и у пациентов группы сравнения не зафиксировано достоверно значимых различий в показателях в группах одного возраста.

Пациентам, достигшим возраста 17 лет, было проведено определение уровня АСАТ в семенной жидкости. В 77 случаях (83,7%) АСАТ не были обнаружены, а в 9 случаях (9,8%) определялся титр 1:50, что соответствовало допустимому референтному интервалу. Превышение нормативных значений зафиксировано в 6 случаях (6,5%), из которых у пяти пациентов (5,4%) титр составил 1:100, а у одного обследуемого (1,1%) был определен титр 1:200.

В группе сравнения из 20 человек только у трех (11,1%) обследуемых был определен титр АСАТ 1:50. У остальных АСАТ в семенной жидкости не были выявлены.

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что ни у одного человека из всех обследуемых не диагностировано повышения уровня АСАТ в сыворотке крови выше допустимых методикой значений.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ УРОВНЯ АСАТ У ПАЦИЕНТОВ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ И ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ ЗА ПЕРИОД 14-17 ЛЕТ

TABLE 1. LEVELS OF ANTISPERM ANTIBODIES IN PATIENTS OF THE MAIN GROUP AND THE COMPARISON GROUP FOR THE PERIOD OF 14-17 YEARS

Показатель Indicator	Основная группа (варикоцеле) Main group (varicocele)				Группа сравнения Comparison group			
	14 лет 14 years n = 92	15 лет 15 years n = 92	16 лет 16 years n = 92	17 лет 17 years n = 92	14 лет 14 years n = 20	15 лет 15 years n = 20	16 лет 16 years n = 20	17 лет 17 years n = 20
Уровень АСАТ в сыворотке крови (Ед/мл) Serum antisperm antibodies (U/ml)	10,76± 6,57	23,96± 11,34	27,63± 10,73	29,25± 11,59	13,82± 12,11	28,74± 9,77	29,09± 8,64	26,77± 8,90
	p ₂	p ₁ ; p ₂ ; p ₃	p ₃		p ₄	p ₁ ; p ₄		

Примечание. p₁ – достоверно значимые различия в уровне АСАТ между пациентами в возрасте 15 лет в основной группе и в группе сравнения (p < 0,05); p₂ – достоверно значимые различия в уровне АСАТ между пациентами в возрасте 14 и 15 лет в основной группе (p < 0,05); p₃ – достоверно значимые различия в уровне АСАТ между пациентами в возрасте 15 и 16 лет в основной группе (p < 0,05); p₄ – достоверно значимые различия в уровне АСАТ между пациентами в возрасте 14 и 15 лет в группе сравнения (p < 0,05).

Note. p₁, significantly significant differences in the level of antisperm antibodies between patients aged 15 years in the main group and in the comparison group (p < 0.05); p₂, significantly significant differences in the level of antisperm antibodies between patients aged 14 and 15 years in the main group (p < 0.05); p₃, significantly significant differences in the level of antisperm antibodies between patients aged 15 and 16 years in the main group (p < 0.05); p₄, significantly significant differences in the level of antisperm antibodies between patients aged 14 and 15 years in the comparison group (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ УРОВНЯ АСАТ ПАЦИЕНТОВ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ВАРИКОЦЕЛЕ

TABLE 2. INDICATORS OF ANTISPERM ANTIBODIES LEVEL IN PATIENTS OF THE MAIN GROUP, DEPENDING ON THE DEGREE OF VARICOCELE

Показатель Indicator	Основная группа (варикоцеле) Main group (varicocele)							
	14 лет, II ст. 14 years, II degree n = 46	14 лет, III ст. 14 years, III degree n = 46	15 лет, II ст. 15 years, II degree n = 46	15 лет, III ст. 15 years, III degree n = 46	16 лет, II ст. 16 years, II degree n = 46	16 лет, III ст. 16 years, III degree n = 46	17 лет, II ст. 17 years, II degree n = 46	17 лет, III ст. 17 years, III degree n = 46
Уровень АСАТ в сыворотке крови (Ед/мл) Serum antisperm antibodies (U/ml)	10,29± 4,72	11,23± 8,04	23,95± 11,48	23,96± 11,32	25,69± 9,05	29,55± 11,98	28,10± 11,41	30,43± 11,79

Примечание. $p > 0,05$ в сравниваемых группах в одном возрастном периоде.

Note. $p > 0.05$ in the compared groups in the same age period.

ТАБЛИЦА 3. УРОВНИ АСАТ ПАЦИЕНТОВ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДАВНОСТИ ОПЕРАТИВНОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА И ПАЦИЕНТОВ ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ

TABLE 3. LEVELS OF ASA OF PATIENTS OF THE MAIN GROUP DEPENDING ON THE PRESCRIPTION OF SURGICAL INTERVENTION AND PATIENTS OF THE COMPARISON GROUP

Показатель Indicator	Основная группа, до операции Main group, before surgery n = 43	Основная группа, после операции Main group, after surgery n = 49	Группа сравнения Comparison group n = 20
Уровень АСАТ в сыворотке крови (Ед/мл) Serum antisperm antibodies (U/ml)	14 лет 14 years		
	10,34±7,74	11,13±5,40	13,82±12,13
	15 лет 15 years		
	23,85±11,97	24,05±10,87	28,74±9,77
	16 лет 16 years		
	27,63±12,03	27,62±9,57	29,09±8,64
	17 лет 17 years		
	29,97±12,69	28,61±10,61	26,77±8,90

Примечание. См примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

Установлена различная динамика показателя для пациентов основной группы и группы сравнения. Наименьший уровень АСАТ зафиксирован у подростков в возрасте 14 лет в обеих группах. Далее у подростков группы сравнения происходит нарастание показателя, наибольшие значения уровня АСАТ отмечены в возрасте 15-16 лет с последующим уменьшением значений в

17 лет. У пациентов с варикоцеле также происходит нарастание уровня АСАТ, который достигает максимальных величин в возрасте 17 лет, но без тенденции к снижению (рис. 1).

Плотные контакты между клетками Сертоли, формирующими гематотестикулярный барьер, образуются тогда, когда первые зародышевые клетки герминативного эпителия вступают в

фазу мейоза, а у человека этот период приходится преимущественно на 15 лет и связан с началом повышения синтеза тестостерона [1]. Кроме того, существует мнение, что проникновение небольшого количества спермальных антигенов через гематотестикулярный барьер имеет физиологическое значение – индукция иммунологической толерантности к антигенам гамет [22]. Возможно, имеющийся уровень АСАТ, определяемый в 14 лет, обеспечен еще не сформированным гематотестикулярным барьером, а резкое повышение уровня АСАТ в 15 лет, характерное для подростков обеих групп, происходит за счет контакта крови с уже начинающими изменяться клетками герминативного эпителия на фоне еще не полностью сформированных контактов между клетками Сертоли. У пациентов группы сравнения нет изменений ткани яичка, и, вероятно, происходит физиологичное формирование гематотестикулярного барьера, что приводит к изоляции герминативного эпителия и последующему снижению уровня АСАТ в сыворотке крови. При варикоцеле в условиях нарушения гемодинамики в тестикуле, ишемии, рефлюкса предположительно отмечается более позднее начало фазы мейоза и процесс формирования гематотестикулярного барьера несколько замедлен, о чем свидетельствует продолжающееся увеличение уровня АСАТ и отсутствие тенденции к снижению в 17 лет. Поэтому, несмотря на то, что в подростковом возрасте уровень АСАТ в сыворотке крови при варикоцеле был в пределах нормы, необходимо дальнейшее наблюдение за такими подростками, чтобы не упустить развития иммунологической формы бесплодия. Получен-

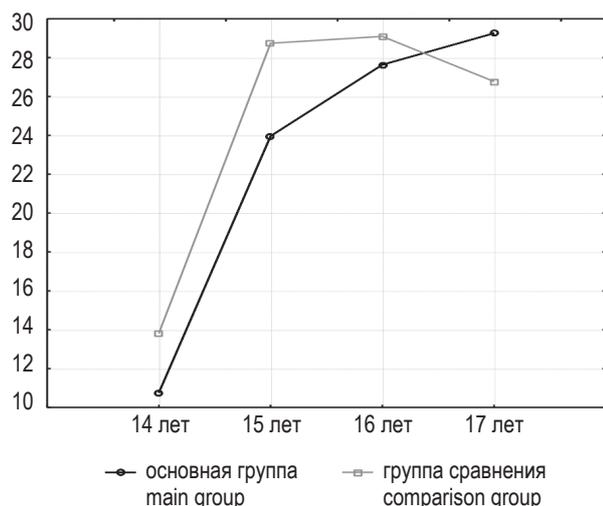


Рисунок 1. Динамика уровня АСАТ у пациентов основной группы и группы сравнения за период 14-17 лет

Figure 1. Dynamics of the level of antisperm antibodies in patients of the main group and the comparison group for a period of 14-17 years

ные результаты у здоровых подростков, на наш взгляд, не могут трактоваться как патологические по ряду причин. Во-первых, несмотря на то, что у здоровых подростков показатели уровня АСАТ более высокие, они, тем не менее, укладываются в значения нормальных величин. Во-вторых, более высокий уровень АСАТ у здоровых подростков сохраняется до 16 лет, а затем наблюдается его снижение, в то время как у подростков с варикоцеле уровень АСАТ неуклонно возрастает и тенденции к снижению не наблюдается. Это, возможно, может свидетельствовать о том, что у здоровых подростков к 16-17 годам сформировался гематотестикулярный барьер, происходит постепенная элиминация ранее образовавшихся АСАТ, дальнейшего синтеза АСАТ не происходит в отличие от подростков с варикоцеле.

Сравнение уровней АСАТ в сыворотке крови у пациентов с II и III степенью варикоцеле не выявило достоверно значимых различий. Это, вероятно, связано с тем, что степень варикоцеле отражает клинические проявления заболевания, а не тяжесть повреждения тестикулярной ткани и, в том числе, гематотестикулярного барьера.

Не установлено достоверно значимой разницы в уровне АСАТ у подростков в возрасте 14 лет, которым исследование проводилось непосредственно перед операцией и подростков, у которых операция была в анамнезе. Дальнейшее исследование показало, что не происходит нарастания показателей АСАТ выше допустимого значения не только после оперативного вмешательства, но в отдаленном послеоперационном периоде. Можно предположить, что оперативное вмешательство на репродуктивных органах не привело к иницированию аутоиммунных реакций.

В основной группе зафиксированы пациенты с повышенным титром АСАТ в семенной жидкости, в то время как в группе сравнения таких пациентов не выявлено. Это требует тщательного исследования эякулята с целью исключения воспалительных процессов в репродуктивном тракте, поскольку именно они являются наиболее частой причиной формирования иммунологической формы infertility.

Выводы

1. Гематотестикулярный барьер не является абсолютно непроницаемым для спермальных антигенов, что способствует поддержанию уровня антиспермальных антител в пределах референтного интервала, необходимого для иммунологической толерантности.

2. У пациентов с варикоцеле не диагностировано повышение уровня АСАТ выше референтного значения, но и не зафиксировано тенденции к снижению уровня АСАТ в сыворотке крови при динамическом исследовании, что требует дальнейшего наблюдения за подростками с це-

лю своевременной диагностики формирования иммунологической формы бесплодия.

3. Уровень АСАТ в сыворотке крови не зависит от степени варикоцеле.

4. Варикоцелэктомия не провоцирует развитие аутоиммунных реакций к сперматозоидам.

5. Наличие АСАТ в семенной жидкости у подростков с варикоцеле требует дальнейшего тщательного обследования пациента с целью выявления воспалительных процессов в репродуктивном тракте и профилактики развития иммунологической формы infertility.

Список литературы / References

1. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы. Под ред. Э. Нишлага и Г.М. Бере. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. 551 с. [Nishlag E., Bere G.M. *Andrology. Men's health and reproductive system dysfunction*. Ed. by E. Nishlag and G.M. Bere]. Moscow: Medical News Agency, 2005. 551 p.

2. Евдокимов В.В., Захариков С.В., Кастрикин Ю.В. Варикоцеле у детей и подростков // Лечение и профилактика, 2017. № 2. С. 53-56. [Evdokimov V.V., Zakharikov S.V., Kastrikin Yu. V. *Varicocele in children and adolescent. Lechenie i profilaktika = Treatment and Prevention*, 2017, no. 2, pp. 53-56. (In Russ.)]

3. Закаидзе С.И. Оптимизация лечебно-диагностического комплекса ведения детей и подростков с варикоцеле // Медицинский вестник Северного Кавказа, 2012. № 2. С. 83-84. [Zakaidze S.I. *Optimization of the treatment and diagnostic complex for managing children and adolescents with varicocele. Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of the North Caucasus*, 2012, no. 2, pp. 83-84. (In Russ.)]

4. Каневская Т.А., Яцык С.П., Безлепкина О.Б. Гормональный статус и маркеры аутоиммунного нарушения сперматогенеза у подростков, перенесших хирургическое лечение по поводу варикоцеле // Педиатрическая фармакология, 2010. Т. 7, № 4. С. 92-94. [Kanevskaya T.A., Yatsyk S.P., Bezlepkina O.B. *Hormonal status and markers of autoimmune disorders of spermatogenesis in adolescents undergoing surgical treatment for varicocele. Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*, 2010, Vol. 7, no. 4, pp. 92-94. (In Russ.)]

5. Комарова С.Ю. Проблемы и перспективы андрологической помощи детям в прогнозе репродуктивного статуса мегаполиса // Уральский медицинский журнал. Детская урология, 2013. № 9. С. 10-13. [Komarova S.Yu. *Problems and prospects of andrological assistance to children in predicting the reproductive status of a megalopolis. Uralskiy meditsinskiy zhurnal. Detskaya urologiya = Ural Medical Journal. Children's Urology*, 2013, no. 9, pp. 10-13. (In Russ.)]

6. Комарова С.Ю., Цап Н.А. Пути снижения риска репродуктивных потерь у детей с варикоцеле // Медицинская наука и образование Урала, 2017. № 1. С. 98-101. [Komarova S.Yu., Tsap N.A. *Ways to reduce the risk of reproductive losses in children with varicocele. Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala = Medical Science and Education of the Urals*, 2017, no. 1, pp. 98-101. (In Russ.)]

7. Неймарк А.И., Неймарк Б.А., Давыдов А.В., Салдан И.П., Ноздрачев Н.А. Реабилитация пациентов с мужским бесплодием после варикоцелэктомии // Эффективная фармакотерапия, 2018. № 9. С. 8-12. [Neymark A.I., Neymark B.A., Davydov A.V., Saldan I.P., Nozdrachev N.A. *Rehabilitation of patients with male infertility after varicocele. Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2018, no. 9, pp. 8-12. (In Russ.)]

8. Неймарк А.И., Попов И.С., Газаматов А.В. Особенности микроциркуляции предстательной железы и гонад у юношей, страдающих изолированным варикоцеле и варикоцеле в сочетании с тазовой конгестией // Андрология, 2013. № 2. С. 56-60. [Neymark A.I., Popov I.S., Gazamatov A.V. *Features of microcirculation of the prostate and gonads in young men suffering from isolated varicocele and varicocele in combination with pelvic congestion. Andrologiya = Andrology*, 2013, no. 2, pp. 56-60. (In Russ.)]

9. Попов И.С., Неймарк А.И., Газаматов А.В. Роль предстательной железы в развитии патоспермии при варикоцеле у подростков // Сибирский медицинский журнал, 2012. № 1. С. 44-47. [Popov I.S., Neymark A.I., Gazamatov A.V. *The role of the prostate gland in the development of pathospermia with varicocele in adolescents. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2012, no. 1, pp. 44-47. (In Russ.)]

10. Шевырин А.А. Современный взгляд на лечение нарушений мужской фертильной функции // РМЖ. Медицинское обозрение, 2018. № 12. С. 30-36. [Shevyrin A.A. *A modern view of the treatment of disorders of male fertile function. RMZh. Meditsinskoe obozrenie = Russian Medical Journal. Medical Review*, 2018, no. 12, pp. 30-36. (In Russ.)]

11. Яцык С.П., Каневская Т.А., Абрамов К.С., Шарков С.М., Фомин Д.К. Репродуктивное здоровье детей и подростков, перенесших хирургическую коррекцию в связи с андрологической патологией // Педиатрическая фармакология, 2009. Т. 6, № 1. С. 15-22. [Yatsyk S.P., Kanevskaya T.A., Abramov K.S., Sharkov S.M., Fomin D.K. *Reproductive health of children and adolescents who underwent surgical correction in connection with andrological pathology. Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*, 2009, Vol. 6, no. 1, pp. 15-22. (In Russ.)]

12. Al-Adi A.M., El-Karamany T., Issa H., Zaazaa M. The influence of antisperm antibodies, intratesticular haemodynamics and the surgical approach to varicocele on seminal variables. *Arab J. Urol.*, 2014, Vol. 4, no. 12, pp. 309-317.

13. Al-Daghistani H.I., Hamad A.W., Abdel-Dayem M., Al-Swaifi M., Abu Zaid M. Evaluation of serum testosterone, progesterone, seminal antisperm antibody, and fructose levels among jordanian males with a history of infertility. *Biochem. Res. Int.*, 2010, 409640. doi: 10.1155/2010/409640.

14. Arena S., Arena F., Maisano D., di Benedetto V., Romeo C., Nicòtina P.A. Aquaporin-9 immunohistochemistry in varicocele testes as a consequence of hypoxia in the sperm production site. *Andrologia*, 2011, Vol. 1, no. 43, pp. 34-37.
15. Bonyadi M.R., Madaen S.K., Saghafi M. Effects of varicocelectomy on anti-sperm antibody in patients with varicocele. *J. Reprod. Infertil.*, 2013, Vol. 2, no. 14, pp. 73-78.
16. Bozhedomov V.A., Lipatova N.A., Alexeev R.A., Alexandrova L.M., Nikolaeva M.A., Sukhikh G.T. The role of the antisperm antibodies in male infertility assessment after microsurgical varicocelectomy. *Andrology*, 2014, Vol. 6, no. 2, pp. 847-855.
17. Bozhedomov V.A., Lipatova N.A., Rokhlikov I.M., Male fertility and varicocele: role of immune factors. *Andrology*, 2014, Vol. 1, no. 2, pp. 51-58.
18. Bozhedomov V.A., Teodorovich O.V. Epidemiology and causes of autoimmune male infertility. *Urologiia*, 2005, no. 1, pp. 35-44.
19. Cui D., Han G., Shang Y., Liu C., Xia L., Li L., Yi S. Antisperm antibodies in infertile men and their effect on semen parameters: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Chim. Acta*, 2015, no. 15, pp. 29-36.
20. Djaladat H., Mehraei A., Rezazade M., Djaladat Y., Pourmand G. Varicocele and antisperm antibody: fact or fiction? *South Med. J.*, 2006, Vol. 1, no. 99, pp. 44-47.
21. Eisenberg M.L., Lipshultz L.I. Varicocele-induced infertility: never insights into its pathophysiology. *Indian J. Urol.*, 2011, no. 27, pp. 58-64.
22. Fijak M., Meinhardt A. The testis in immune privilege. *Immunol. Rev.*, 2006, Vol. 213, pp. 66-81.
23. Jensen C.F.S., Khan O., Nagras Z.G. Sønksen J., Fode M., Østergren P.B., Shah T, Ohl D.A., CopMich Collaborative. Male infertility problems of patients with strict sperm morphology between 5-14% may be missed with the current WHO guidelines. *Scand. J. Urol.*, 2018, Vol. 5-6, no. 52, pp. 427-431.
24. Jiang H., Zhu W.J. Testicular microlithiasis is not a risk factor for the production of antisperm antibody in infertile males. *Andrologia*, 2013, Vol. 5, no. 45, pp. 305-309.
25. McLachlan R.I. Basis, diagnosis and treatment of immunological infertility in men. *J. Reprod. Immunol.*, 2002, Vol. 1-2, no. 57, pp. 35-45.
26. Naughton C.K., Nangia A.K., Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum. Reprod. Update*, 2011, no. 7, pp. 461-472.
27. Restrepo B., Cardona-Maya W. Antisperm antibodies and fertility association. *Actas Urol. Esp.*, 2013, Vol. 9, no. 37, pp. 571-578.
28. Ulcova-Gallova Z., Gruberova J., Vrzalova J., Bibkova K., Peknicova J., Micanova Z., Topolcan O. Sperm antibodies, intra-acrosomal sperm proteins, and cytokines in semen in men from infertile couples. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2009, Vol. 3, no. 61, pp. 236-245.
29. Yasin A.L., Yasin A.L., Basha W.S. The epidemiology of anti-sperm antibodies among couples with unexplained infertility in North West Bank, Palestine. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2016, Vol. 3, no. 10, pp. 1-3.
30. Zhao Y., Zhao E., Zhang C, Zhang H. Study of the changes of acrosomal enzyme, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase of infertile patients with positive antisperm antibody in seminal plasma. *Cell Biochem. Biophys.*, 2015, Vol. 3, no. 73, pp. 639-642.

Авторы:

Пичугова С.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; врач высшей категории, лаборатория электронной микроскопии МАУ «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург, Россия

Рыбина И.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; врач высшей категории, лаборатория клинической генетики МАУ «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург, Россия

Бейкин Я.Б. — д.м.н., заслуженный врач РФ, заведующий лабораторией иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; главный врач МАУ «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Pichugova S.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Laboratory Doctor, Clinical Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation

Rybina I.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Clinical Geneticist, Clinical Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation

Beikin Ya.B., PhD, MD (Medicine), Honored Doctor of the Russian Federation, Head, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Chief Physician, Clinical Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation.

Поступила 17.10.2019

Отправлена на доработку 15.12.2019

Принята к печати 13.05.2020

Received 17.10.2019

Revision received 15.12.2019

Accepted 13.05.2020

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ЛЮМИНОЛ-ЗАВИСИМУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Бочкова М.С., Тимганова В.П., Храмцов П.В., Ужвиюк С.В.,
Шардина К.Ю., Нечаев А.И., Раев М.Б., Заморина С.А.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал
ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук,
г. Пермь, Россия

Резюме. Графен и его производные все чаще используются в биомедицинских исследованиях, поэтому в настоящее время усиленно изучаются механизмы и последствия взаимодействия наночастиц графена с живыми объектами. Иммунная система участвует в защите организма человека и регуляции его функций, поэтому вопрос о воздействии графена и его производных на иммунные клетки является принципиальным. Специфическим ответом моноцитов, макрофагов и нейтрофилов на стимул или раздражитель является увеличение продукции активных форм кислорода (АФК). Поскольку литературные данные по влиянию оксида графена (ОГ) и пегилированного оксида графена (ОГ-ПЭГ) на лейкоциты периферической крови немногочисленны и противоречивы, ввиду использования разных концентрации частиц, разных условий и различных объектов исследования, представлялось важным оценить влияние ОГ и ОГ-ПЭГ на продукцию АФК лейкоцитами человека.

Целью нашего исследования явилось изучение влияния частиц немодифицированного и модифицированного ПЭГ оксида графена на продукцию АФК лейкоцитами периферической крови в тесте спонтанной и стимулированной люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Стимуляцию продукции АФК осуществляли опсонизированным зимозаном (ОЗ). Для оценки самостоятельного эффекта наночастиц на тушение люминесценции использовали бесклеточную систему с люминолом и перекисью водорода. В работе использовали наночастицы ОГ (Ossila, Великобритания), с поверхностью, модифицированной ПЭГ (ОГ-ПЭГ). Средний размер пластин ОГ составлял 1-5 мкм, ОГ-ПЭГ после модификации 569 ± 14 нм, количество покрывающего ПЭГ ~ 20%. Наночастицы применяли в концентрациях 5; 2,5; 1,25 мкг/мл.

Установлено, что наночастицы ОГ-ПЭГ в концентрациях 2,5 и 5 мкг/мл угнетали продукцию АФК в спонтанном варианте ЛЗХЛ, в то время как эффекты ОГ демонстрировали видимую, но не достоверную тенденцию к угнетению ЛЗХЛ. Аналогичные результаты были получены в стимулированном варианте ЛЗХЛ. Однако при анализе процесса в кинетике продукцию АФК снижали как ОГ-ПЭГ, так

Адрес для переписки:

Бочкова Мария Станиславовна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: krasnykh-m@mail.ru

Address for correspondence:

Bochkova Maria S.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.
Phone: 7 (342) 280-77-94.
Fax: 7 (342) 280-92-11.
E-mail: krasnykh-m@mail.ru

Образец цитирования:

М.С. Бочкова, В.П. Тимганова, П.В. Храмцов,
С.В. Ужвиюк, К.Ю. Шардина, А.И. Нечаев, М.Б. Раев,
С.А. Заморина «Изучение влияния наночастиц оксида
графена на люминол-зависимую хемилюминесценцию
лейкоцитов человека» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 5. С. 977-986.
doi: 10.15789/1563-0625-SOT-2051

© Бочкова М.С. и соавт., 2020

For citation:

M.S. Bochkova, V.P. Timganova, P.V. Khramtsov,
S.V. Uzhviyuk, K.Yu. Shardina, A.I. Nechaev, M.B. Raev,
S.A. Zamorina "Study of the graphene oxide nanoparticles
effect on luminol-dependent chemiluminescence of human
leukocytes", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 977-986.
doi: 10.15789/1563-0625-SOT-2051

DOI: 10.15789/1563-0625-SOT-2051

и ОГ, преимущественно в первые минуты теста. При анализе эффекта тушения люминесценции в бесклеточной системе достоверного влияния наночастиц ОГ и ОГ-ПЭГ выявлено не было.

Таким образом, общий вектор полученных эффектов был связан с подавлением продукции АФК. Депрессивные эффекты ОГ-ПЭГ на продукцию АФК лейкоцитами были более выраженными в сравнении с немодифицированным ОГ. В целом нами были подтверждены антиоксидантные эффекты ОГ и ОГ-ПЭГ при помощи метода ЛЗХЛ. Можно предположить, что, помимо собственно антиоксидантного эффекта наночастиц графена, продукция АФК снижается вследствие быстрого поглощения ОГ и блокирования ряда внутриклеточных сигналов, индуцирующих респираторный взрыв.

Ключевые слова: оксид графена, полиэтиленгликоль, люминол-зависимая хемилюминесценция, лейкоциты, активные формы кислорода

STUDY OF THE GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES EFFECT ON LUMINOL-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE OF HUMAN LEUKOCYTES

Bochkova M.S., Timganova V.P., Khramtsov P.V., Uzhviyuk S.V., Shardina K.Yu., Nechaev A.I., Raev M.B., Zamorina S.A.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. Graphene and its derivatives are increasingly used in biomedical research. Therefore, the mechanisms and consequences of the interaction of graphene nanoparticles with living objects are intensively studied. The immune system is involved in protecting the body and regulating its functions, so the question of the effect of graphene and its derivatives on immune cells is crucial. The specific response of monocytes, macrophages, and neutrophils to a stimulus is to increase the production of reactive oxygen species (ROS). Published data on graphene oxide (GO) and polyethylene glycol-modified graphene oxide (GO-PEG) effects on peripheral blood leukocytes are scarce and contradictory. It is due to variations in objects and conditions of study, along with the difference in particle concentrations. Thus, it was essential to evaluate the GO and GO-PEG effect on ROS production by human leukocytes.

Our study aimed at the effect of particles of unmodified and PEG-modified graphene oxide (GO and GO-PEG) on the ROS production by peripheral blood leukocytes in not-stimulated and stimulated luminol-dependent chemiluminescence (LCL) tests. ROS production was stimulated by opsonized zymosan (OZ). A hydrogen peroxide-luminol system was used for assessing the independent effect of GO nanoparticles on the quenching of ROS luminescence. Pristine GO (Ossila, Great Britain) nanoparticles were PEG-modified (GO-PEG). The average size of the GO flakes was 1-5 μm , the GO-PEG-flakes 569 ± 14 nm, and the amount of PEG covering was $\sim 20\%$. Nanoparticles were used at concentrations of 5; 2.5; 1.25 $\mu\text{g/ml}$.

It has been established that GO-PEG nanoparticles in concentrations of 2.5 and 5 $\mu\text{g/ml}$ suppressed ROS production in the spontaneous LCL test. At the same time, the GO effects showed a visible but a not significant tendency to inhibition of LCL. Similar results were obtained in the stimulated LCL test. However, when analyzing the process kinetics, both GO-PEG and GO decreased the ROS production, but mainly in the first minutes of the test. When analyzing the quenching effect of the LCL reaction in a cell-free system, there was no significant effect of GO and GO-PEG nanoparticles.

Thus, the general vector of the obtained effects was associated with the suppression of ROS production. GO-PEG ROS-decreasing effects were more pronounced in comparison with unmodified GO. In general, we have confirmed the antioxidant effects of GO and GO-PEG using the LCL method. We can assume that in addition to the actual antioxidant effect of graphene nanoparticles, ROS production decreases due to the rapid GO uptake and blocking of several intracellular signals that induce an oxidative burst.

Keywords: graphene oxide, polyethylene glycol, luminol-dependent chemiluminescence, leukocytes, reactive oxygen species

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-15-00244.

Введение

Графен является двумерной аллотропной модификацией углерода, которая, в зависимости от размеров и структурных вариаций, может обладать разнообразным ценным для биомедицины свойствами: высокой удельной площадью поверхности, способностью к флуоресценции, антимикробной активностью, каталитической активностью. В связи с этим активно исследуется потенциал применения графена в иммунопрофилактике, адресной доставке лекарственных средств, биомаджинге, фототермальной терапии. Существенным препятствием на пути внедрения наноматериалов в клиническую практику являются весьма неполные знания об их безопасности для живых организмов. По этой причине в настоящее время усиленно изучаются механизмы и последствия взаимодействия наночастиц, в том числе и графена, с живыми объектами. Иммунная система участвует в защите организма человека и регуляции его функций, поэтому вопрос о воздействии графена и его производных на иммунные клетки является принципиальным. Его решение важно и с точки зрения применения обнаруженных эффектов в иммунопрофилактике и терапии, например, при использовании графена как адьюванта. В этой работе мы исследовали влияние различных концентраций наночастиц оксида графена (ОГ) и наночастиц оксида графена, модифицированных полиэтиленгликолем (ОГ-ПЭГ) на продукцию активных форм кислорода лейкоцитами. Оксид графена был выбран нами, поскольку он сохраняет многие физико-химические свойства графена, но при этом более гидрофилен, а также содержит ряд функциональных групп, облегчающих его функционализацию.

Специфическим ответом моноцитов, макрофагов и нейтрофилов на стимул или раздражитель является увеличение продукции свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) – кислородный взрыв, который направлен на уничтожение чужеродных объектов. В ряде работ показано, что ОГ способствует инициации кислородного взрыва в нейтрофилах и макрофагах [14]. Предположительный механизм инициации выработки АФК описан на клеточной линии мышечных альвеолярных макрофагов (MHS). Он заключается в воздействии ОГ на окислительно-восстановительные реакции митохондриальной цепи переноса электронов, ускоряющем генерацию АФК как побочного продукта митохондриального дыхания. Однако продемонстрирован и противоположный, антиоксидантный эффект ОГ

на мышечные макрофаги, выделенные из костного мозга, выражающийся в сниженной выработке клетками АФК [4].

Поскольку литературные данные по влиянию ОГ и ОГ-ПЭГ на лейкоциты периферической крови немногочисленны и достаточно противоречивы ввиду использования разных концентраций частиц, разных условий и различных объектов исследования, в данной работе оценивали продукцию АФК периферическими лейкоцитами крови человека после кратковременного воздействия наночастиц.

Целью нашего исследования явилось изучение влияния наночастиц ОГ и модифицированного полиэтиленгликолем ОГ (ОГ-ПЭГ) на продукцию АФК лейкоцитами человека в тесте спонтанной и стимулированной зимозаном люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ).

Материалы и методы

Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 года и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 года, на работу с образцами периферической крови было получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 30.08.2019.

Модификация наночастиц оксида графена

В работе применялись частицы оксида графена, размер 1–5 мкм (Ossila Ltd, Великобритания). Монохлоруксусная кислота (99%), 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC, 98%), N-гидроксисукцинимид (NHS, > 98%), метоксиполиэтиленгликоль амин mPEG-NH₂ (MW 5 kDa) производства Alfa Aesar (США). Для синтезов применялась деионизованная вода (1-го класса), полученная с помощью системы очистки Merck Millipore Simplicity. Все реактивы использовались без дополнительной очистки.

Модификация ОГ ПЭГом (пегилирование) осуществляли методом ковалентной пришивки аминогрупп ПЭГ-NH₂ к поверхностным карбоксильным группами ОГ с образованием амидной связи. Для модификации готовили растворы ОГ концентрацией 2 мг/мл ультразвуковой обработкой мощностью 25 Вт в течение 30 мин. Карбоксилирование ОГ проводили в щелочной среде (NaOH) в присутствии Cl-CH₂-COOH при ультразвуковой обработке в течение 1 ч. Полученный раствор ОГ-СООН нейтрализовали многократной промывкой деионизованной водой. Далее к суспензии ОГ-СООН (рН 5,6) при ультразвуковой обработке в течение 5 мин добавляли NHS (10 ммоль/л), EDC (4 ммоль/л) и ПЭГ-NH₂ (2 мг/мл), для окончания реакции ковалентной пришивки ПЭГ раствор оставляли

при комнатной температуре на сутки. Полученную суспензию ОГ-ПЭГ очищали методом диализа и трехкратной промывкой с центрифугированием этиловым спиртом с финальной сушкой при 65 °С под вакуумом.

ИК-Фурье спектры исходного и модифицированных ОГ были получены на спектрометре IFS 66/S Bruker в области 400–4000 см⁻¹. Образцы для анализа готовили прессованием таблеток с KBr (2 мг образца к 299 мг KBr). Спектры поглощения растворов исходного и модифицированных ОГ были определены на двухлучевом спектрофотометре UV 2600 в диапазоне длин волн 200–900 нм. Распределение исходного и модифицированных ОГ по размеру, а также их дзета-потенциал в водных растворах определяли методом динамического светорассеяния на приборе ZetaPALS Brookhaven. Термогравиметрический анализ исходного и модифицированных ОГ был проведен на совмещенном ТГ-ДСК приборе NETZSCH STA 449 F1 при скорости нагревания 10 К/мин в диапазоне температур 30–700 °С.

Проведенные исследования пегелированных образцов ОГ показали, что процесс химической модификации прошел успешно, ароматическая структура ОГ не изменилась, а средний размер наночастиц пегелированного ОГ по сравнению с исходным, заявленным производителем 1–5 мкм, снизился до 569±14 нм, а количество покрывающего ОГ ПЭГа составляет порядка 19–20%.

Объекты исследования

В работе использовали лейкоциты крови условно здоровых доноров (n = 5, 35±7), которые выделяли спонтанной седиментацией в течение 40 минут при t = 37 °С. Эритроциты осаждали, а сыворотку с оставшимися в ней клетками отделяли. Далее клетки отмывали от сыворотки трехкратным центрифугированием при 350 g в течение 15 минут при помощи раствора Хэнкса без фенолового красного («Биолот», Россия) и доводили до концентрации 10⁶ клеток в мл. Все манипуляции проводили при 4 °С.

Постановка реакции ЛЗХЛ

Для оценки уровня ЛЗХЛ в лунки 96-луночного стерильного планшета для люминометра (Nunc, Дания) последовательно вносили раствор Хэнкса, ОГ и ОГ-ПЭГ в различных концентрациях (5 мкг/мл; 2,5 мкг/мл; 1,25 мкг/мл; 0 мкг/мл [15] (контроль — спонтанная ЛЗХЛ), 10 мкл суспензии клеток (10⁶/мл) и натриевую соль люминола (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 2 × 10⁻³ М. Индуктором кислородного взрыва выступал опсонизированный зимозан (ОЗ), поэтому в стимулированном варианте

ЛЗХЛ добавляли ОЗ до конечной концентрации 5 мкг/мл; 2,5 мкг/мл; 1,25 мкг/мл.

Кроме этого оценивали степень гашения ЛЗХЛ частицами ОГ и ОГ-ПЭГ (концентрации указаны выше) в бесклеточной системе. Эксперимент проводили таким же образом, как описано в предыдущем абзаце, за исключением того, что не добавляли зимозан и суспензию клеток, а люминесценцию индуцировали при помощи перекиси водорода. Концентрации перекиси водорода составляли 3%; 1,5%; 0,75%; 0,375%; 0,187%.

Интенсивность люминесценции измеряли в течение 60 минут с интервалом в 3 минуты на гибридном ридере “Synergy H1” (BioTek). Оценивали изменение люминесценции в динамике, а также рассчитывали интегральный показатель светосумму (S), то есть площадь под кривой хемилюминесценции, характеризующую суммарный синтез АФК за 60 мин исследования и равную сумме всех значений интенсивности люминесценции для каждой пробы.

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 6 с использованием теста Фридмана и post-hoc теста Данна для множественных сравнений. Данные представляли в виде медианы с межквартильным размахом — Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Различия считали достоверными при p < 0,05.

Результаты

Известно, что стимуляция лейкоцитов сопровождается генерацией активных форм кислорода (супероксид анион, перекись водорода, гидроксил радикал, активные формы хлора), обладающих мощным бактерицидным действием. Таким образом, ЛЗХЛ характеризует суммарную продукцию АФК лейкоцитами крови.

Влияние ОГ и ОГ-ПЭГ на интенсивность спонтанной ЛЗХЛ

Повышение концентрации ОГ и ОГ-ПЭГ от 1,25 до 5 мкг/мл приводило к уменьшению ЛЗХЛ, однако эти эффекты были статистически достоверными лишь для концентраций ОГ-ПЭГ равных 2,5 и 5 мкг/мл медианы светосумм были ниже медианы светосуммы пробы без наночастиц на 21, 39 и 45% соответственно. При исследовании аналогичных концентраций ОГ снижение медианного значения светосумм было менее существенным (на 9, 17 и 25%).

Влияние наночастиц ОГ и ОГ-ПЭГ на спонтанную и стимулированную ЛЗХЛ

Стоит отметить существенную вариабельность значений светосумм между образцами, получен-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОГ И ОГ-ПЭГ НА СПОНТАННУЮ И СТИМУЛИРОВАННУЮ ЛЗХЛ
TABLE 1. EFFECT OF GO AND GO-PEG NANOPARTICLES ON THE SPONTANEOUS AND STIMULATED LUMINOL-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE (LCL)

	ОЗ (мкг/мл) OZ (µg/ml)	ОГ-ПЭГ (мкг/мл) GO-PEG (µg/ml)				ОГ (мкг/мл) GO (µg/ml)			
		0	1,25	2,5	5	0	1,25	2,5	5
Светосумма Light sum Me (Q _{0.25} -Q _{0.75})	Спонтанный вариант ЛЗХЛ Spontaneous LCL option								
	0	33401 (27240-43355)	26427 (20407-34599)	20402 (15695-29110) p < 0,05*	18211 (15574-24117) p < 0,05*	43715 (30563-55617)	39603 (28814-51010)	36278 (27860-46441)	32889 (25083-42972)
	Стимулированный вариант ЛЗХЛ Stimulated LCL option								
	1,25	35762 (25537-50842)	27241 (21875-36865)	20118 (17249-28516) p < 0,05*	18277 (16898-24519) p < 0,05*	50348 (38379-59529)	47151 (35959-55585)	43162 (32673-53438)	43901 (35654-50210)
	2,5	38366 (29432-51883)	32811 (29443-40998)	26469 (22934-32115) p < 0,05*	19955 (19343-25224) p < 0,05*	59020 (45397-68240)	52095 (37669-62478)	51218 (37523-61413)	47908 (36101-57789)
	5	45829 (40440-54533)	42900 (40902-49030)	38128 (35268-44080)	28278 (26660-33799)	75785 (58847-82171)	71565 (53195-80774)	64148 (49243-72062)	57067 (42777-67541)
Снижение медианы светосуммы образца по отношению к контролю Decrease of lighth sum medians of sample in relation to control	Спонтанный вариант ЛЗХЛ Spontaneous LCL option								
	0	–	21%	39%	45%	–	9%	17%	25%
	Стимулированный вариант ЛЗХЛ Stimulated LCL option								
	1,25	–	24%	44%	49%	–	6%	14%	13%
	2,5	–	14%	31%	48%	–	12%	13%	19%
	5	–	6%	17%	38%	–	6%	15%	25%

Примечание. n = 5; p < 0,05 – достоверные по критерию Фридмана и критерию Данна для множественных сравнений различия по сравнению с соответствующей пробой без ОГ/ОГ-ПЭГ (первый столбец).

Note. n = 5; p < 0.05, significant differences according to the Friedman test and Dunn's test for multiple comparisons compared to the corresponding sample without GO/GO-PEG (first column).

ными от различных доноров, в том числе в экспериментах с зимозан-индуцированной ЛЗХЛ.

Таким образом, установлено, что наночастицы ОГ-ПЭГ в концентрациях 2,5 и 5 мкг/мл угнетали продукцию АФК в спонтанном варианте ЛЗХЛ, в то время как эффекты ОГ демонстриро-

вали видимую, но недостоверную тенденцию к угнетению ЛЗХЛ.

Влияние ОГ и ОГ-ПЭГ на интенсивность стимулированной зимозаном ЛЗХЛ

Мы использовали три различные концентрации зимозана для стимуляции ЛЗХЛ лейкоцита-

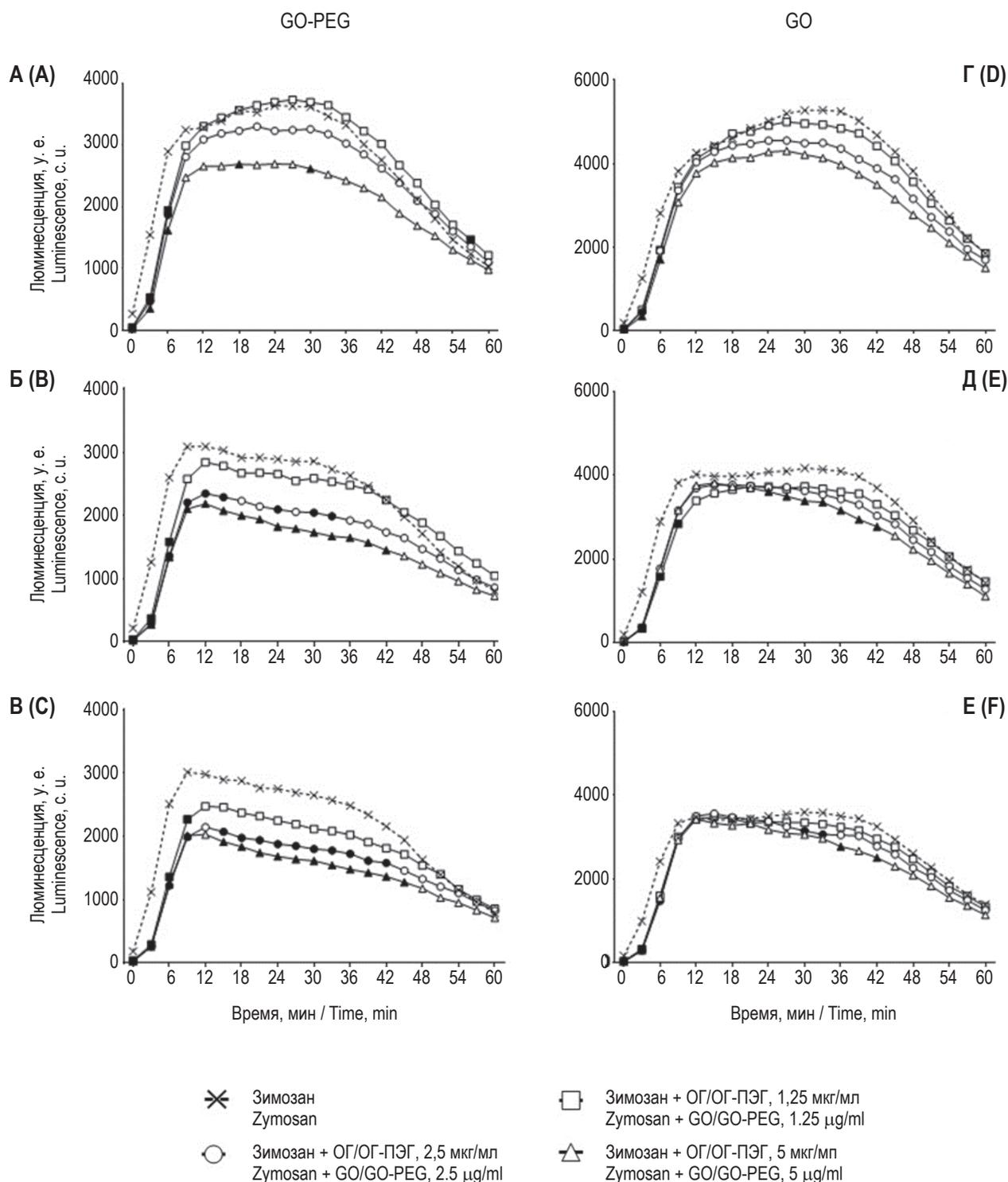


Рисунок 1. Влияние разных концентраций ОГ-ПЭГ и ОГ на кинетику ЛЗХЛ, стимулированной ОЗ, n = 5
Примечание. А, Б, В – пробы с ОГ-ПЭГ и 5, 2,5 и 1,25 мкг/мл зимозана соответственно. Г, Д, Е – пробы с ОГ и 5, 2,5 и 1,25 мкг/мл зимозана соответственно. Достоверные по критерию Фридмана и критерию Данна для множественных сравнений различия ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующей пробой без ОГ/ОГ-ПЭГ обозначены заштрихованным (черным) маркером.
Figure 1. Effect of GO-PEG and GO different concentrations on the kinetics of LCL stimulated by opsonized zymosan (OZ), n = 5
Note. A, B, C, samples with GO-PEG and 5, 2.5 and 1.25 µg/ml zymosan, respectively. D, E, F, samples with GO and 5, 2.5 and 1.25 µg/ml zymosan, respectively. Significant differences ($p < 0.05$), by the Friedman test and the Dunn test for multiple comparisons, compared with the corresponding sample without GO/GO-PEG are indicated by a shaded (black) marker.

ми. Наночастицы как ОГ, так и ОГ-ПЭГ снижали ЛЗХЛ, при этом лишь наночастицы ОГ-ПЭГ в концентрациях 2,5 и 5 мкг/мл статистически достоверно снижали ЛЗХЛ при стимуляции зимозаном в концентрациях 1,25 и 2,5 мкг/мл (табл. 1). Эффект подавления ЛЗХЛ был в большей степени выражен для наночастиц ОГ-ПЭГ, чем для наночастиц ОГ.

При анализе кинетики стимулированной ЛЗХЛ, было выявлено снижение люминесценции под влиянием ОГ и ОГ-ПЭГ во всех тестовых концентрациях начиная с самого начала реакции (рис. 1). При этом достоверные эффекты были отмечены преимущественно в начале реакции (0-9 минуты), однако заметна видимая тенденция к сохранению этого эффекта до выхода на плато (рис. 1).

Довольно интересно, что при использовании ОЗ в концентрации 5 мкг/мл снижение продукции АФК под воздействием наночастиц не фиксировались. По-видимому, подавляющий эффект наночастиц в данном случае компенсировался более интенсивной стимуляцией клетки со стороны ОЗ.

Таким образом, в стимулированном варианте ЛЗХЛ, наночастицы ОГ-ПЭГ (2,5 и 5 мкг/мл) подавляли продукцию АФК лейкоцитами, а наночастицы ОГ не оказывали достоверного эффекта. Однако при анализе процесса в кинетике продукции АФК снижали как ОГ-ПЭГ, так и ОГ, преимущественно в первые минуты теста.

Влияние ОГ и ОГ-ПЭГ на ЛЗХЛ в бесклеточной модели с перекисью водорода

Поскольку ОГ и ОГ-ПЭГ снижали ЛЗХЛ лейкоцитов крови, мы предположили, что причиной этого может быть эффект тушения люминесценции частицами, не связанный с их воздействием на клетки. Поэтому мы смоделировали ЛЗХЛ, но без добавления лейкоцитов. В качестве индуктора люминесценции мы использовали перекись водорода. В результате проведенного исследования, эффекта тушения люминесценции наночастицами ОГ и ОГ-ПЭГ выявлено не было (данные не представлены).

Обсуждение

В ходе проведенных исследований мы установили, что присутствие наночастиц ОГ и ОГ-ПЭГ в среде с лейкоцитами приводит к снижению ЛЗХЛ с первых же минут после начала реакции, при этом эффект ОГ-ПЭГ был более выраженным. Была отмечена прямая зависимость между концентрацией наночастиц ОГ/ОГ-ПЭГ и уменьшением светосуммы.

Существуют различные возможные способы влияния наночастиц ОГ на ЛЗХЛ. Во-первых,

наночастицы ОГ могут непосредственно взаимодействовать с АФК и люминолом, изменяя интенсивность ЛЗХЛ, во-вторых, ОГ может оказывать влияние на продукцию АФК лейкоцитами.

Статическое и динамическое тушение флуоресценции ряда органических флуорофоров ОГ было продемонстрировано Povedailo и соавт. [10]. Более того, тушение люминесценции люминола было показано как для смеси люминола и ОГ [3], так и для комплексов ОГ с адсорбированным люминолом [6]. Однако мы установили, что ОГ не подавлял люминесценцию люминола, инициированную H_2O_2 в бесклеточной системе. Известно, что ЛЗХЛ отражает суммарную (внутриклеточную и внеклеточную) продукцию АФК, прежде всего супероксид-аниона, а кроме того перекиси водорода. Для инициации ЛЗХЛ при помощи H_2O_2 требуются либо ее высокие концентрации (как в указанном контрольном эксперименте), либо присутствие пероксидаз, в частности миелопероксидазы нейтрофилов [2].

Данные об антиоксидантной активности ОГ в отношении различных форм АФК достаточно противоречивы. Согласно одним исследованиям он проявляет очень низкую антиоксидантную активность по отношению к H_2O_2 и OH^* в концентрациях, которые были использованы в нашей работе [1, 7], в то же время в статье Qui et al. [11] говорится о высокой антиоксидантной активности ОГ в концентрации 10 мкг/мл и менее в отношении OH^* , а также о его способности нейтрализовать супероксид-анион (в концентрации около 80 мкг/мл). Химическая модификация ОГ (допирование азотом, введение различных функциональных групп) существенно увеличивает его антиоксидантную активность [13], в связи с этим можно предположить, что пегилирование оказывает влияние на нейтрализацию АФК ОГ, однако Nilewski и соавт. [9] показали, что пегилирование не оказывает существенного эффекта на антиоксидантную активность ОГ в отношении супероксид-аниона.

Таким образом, взаимодействие ОГ с АФК является одной из возможных причин снижения интенсивности люминесценции. Различия между пегилированным и не пегилированным ОГ заключаются, по всей видимости, в большей удельной площади поверхности ОГ-ПЭГ в сравнении с ОГ ввиду их меньшего размера. Кроме того, наночастицы ОГ-ПЭГ ввиду поверхностной модификации в меньшей степени агрегировали в культуральной среде, что также увеличивало их удельную площадь поверхности относительно ОГ.

Еще одно объяснение подавления ЛЗХЛ под воздействием ОГ заключается в его влиянии на

продукцию АФК лейкоцитами. Показано, что зимозан быстро (минута или даже меньше) активизирует Dectin-1-ассоциированные кальций-зависимые сигнальные пути, что сопровождается фосфорилированием ряда сигнальных молекул [5], в частности кальмодулин-зависимой киназы и других. Ранее было показано, что ОГ обладает способностью снижать уровень фосфорилирования некоторых переносчиков внутриклеточных сигналов, в частности протеинкиназы В и ингибировать экспрессию индуцибельной NO-синтазы макрофагов [4], а значит, снижение продукции АФК посредством быстрого блокирования внутриклеточных сигналов ОГ является вероятным сценарием. Тем не менее в большинстве исследований показано усиление продукции АФК клетками под воздействием ОГ, что, в частности, является основой концепции его использования в фотодинамической терапии [14]. В наших экспериментах эффект ОГ на продукцию АФК проявлялся уже в первые минуты после его добавления к суспензии лейкоцитов. Достаточно сложно сказать, могли ли частицы ОГ и ОГ-ПЭГ оказать воздействие на лейкоциты за столь ко-

роткое время. Согласно имеющимся данным интернализация частиц оксида графена протекает весьма быстро: частицы ОГ размером 453 нм уже через 2 минуты после начала инкубации обнаруживались внутри макрофагов (в отличие от более мелких частиц) [8]. Это говорит о возможности того, что эффекты ОГ могут проявляться почти мгновенно. С другой стороны, в исследованиях, в которых было показано снижение продукции АФК клетками, использовалась длительная предварительная инкубация исследуемых клеток с оксидом графена [4, 12]. Стоит отметить, что размер наночастиц ОГ, а также характер их модификации может оказывать влияние на механизмы взаимодействия клеток и графена.

Таким образом, нами были подтверждены антиоксидантные эффекты ОГ и ОГ-ПЭГ при помощи метода ЛЗХЛ. Механизмы, лежащие в основе этих эффектов, мы планируем установить в дальнейшем. Антиоксидантные свойства графена могут быть использованы в терапевтических целях, однако для этого еще предстоит найти способы регулировать баланс между его про- и антиоксидантной активностью.

Список литературы / References

1. Baali N., Khecha A., Bensouici A., Speranza G., Hamdouni N. Assessment of antioxidant activity of pure graphene oxide (GO) and ZnO-decorated reduced graphene oxide (rGO) using dpqh radical and H₂O₂ scavenging assays. *J. Carbon Res.*, 2019, Vol. 5, no. 4, 75. doi: 10.3390/c5040075.
2. Bedouhène S., Mouliti-Mati F., Hurtado-Nedelec M., Dang P.M., El-Benna J. Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils. *Am. J. Blood Res.*, 2017, Vol. 7, no. 4, pp. 41-48.
3. Bi S., Zhao T., Luo B. A graphene oxide platform for the assay of biomolecules based on chemiluminescence resonance energy transfer. *Chem. Commun.*, 2012, Vol. 48, Iss. 1, pp. 106-108.
4. Han J., Kim Y.S., Lim M.Y., Kim H.Y., Kong S., Kang M., Choo Y.W., Jun J.H., Ryu S., Jeong H.Y., Park J., Jeong G.J., Lee J.C., Eom G.H., Ahn Y., Kim B.S. Dual roles of graphene oxide to attenuate inflammation and elicit timely polarization of macrophage phenotypes for cardiac repair. *ACS Nano*, 2018, Vol. 12, pp. 1959-1977.
5. Kelly E.K., Wang L., Ivashkiv L.B. Calcium-activated pathways and oxidative burst mediate zymosan-induced signaling and IL-10 production in human macrophages. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, Iss. 10, pp. 5545-5552.
6. Lee M.Y., Kim S.Y., Kim H.G., In I. Chemiluminescence quenching of luminol-functionalized chemically reduced graphene oxide through noncovalent interaction. *Chem. Lett.*, 2013, Vol. 42, no. 1, pp. 48-49.
7. Marković Z.M., Jovanović S.P., Mašković P.Z., Mojsin M.M., Stevanović M.J., Danko M., Mičušík M., Jovanović D.J., Kleinová A., Špitalský Z., Pavlović V.B., Todorović Marković B.M. Graphene oxide size and structure pro-oxidant and antioxidant activity and photoinduced cytotoxicity relation on three cancer cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2019, Vol. 200, 111647. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111647.
8. Mendes R.G., Mandarino A., Koch B., Meyer A.K., Bachmatiuk A., Hirsch C., Gemming T., Schmidt O.G., Liu Z., Rummeli M.H. Size and time dependent internalization of label-free nano-graphene oxide in human macrophages. *Nano Res.*, 2017, Vol. 10, pp. 1980-1995.
9. Nilewski L., Mendoza K., Jalilov A.S., Berka V., Wu G., Sikkema W.K.A., Metzger A., Ye R., Zhang R., Luong D.X., Wang T., McHugh E., Derry P.J., Samuel E.L., Kent T.A., Tsai A.L., Tour J.M. Highly oxidized graphene quantum dots from coal as efficient antioxidants. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 2019, Vol. 11, Iss. 18, pp. 16815-16821.
10. Povedailo V.A., Ronishenko B.V., Stepuro V.I., Tsybulsky D.A., Shmanai V.V., Yakovlev D.L. Fluorescence quenching of dyes by graphene oxide. *J. Appl. Spectro.*, 2018, Vol. 85, pp. 605-610.
11. Qiu Y., Wang Z., Owens A.C., Kulaots I., Chen Y., Kane A.B., Hurt R.H. Antioxidant chemistry of graphene-based materials and its role in oxidation protection technology. *Nanoscale*, 2014, Vol. 6, Iss. 20, pp. 11744-11755.

12. Ren C., Hu X., Zhou Q. Graphene oxide quantum dots reduce oxidative stress and inhibit neurotoxicity *in vitro* and *in vivo* through catalase-like activity and metabolic regulation. *Adv. Sci.*, 2018, Vol. 5, Iss. 5, 1700595. doi: 10.1002/advs.201700595.
13. Ruiz V., Yate L., García I., Cabanero G., Grande H.J. Tuning the antioxidant activity of graphene quantum dots: protective nanomaterials against dye decoloration. *Carbon*, 2017, Vol. 116, pp. 366-374.
14. Tabish T.A., Zhang S., Winyard P.G. Developing the next generation of graphene-based platforms for cancer therapeutics: The potential role of reactive oxygen species. *Redox Biol.*, 2018, Vol. 15, pp. 34-40.
15. Xu M., Zhu J., Wang F., Xiong Y., Wu Y., Wang Q., Weng J., Zhang Z., Chen W., Liu S. Improved *in vitro* and *in vivo* biocompatibility of graphene oxide through surface modification: poly (acrylic acid)-functionalization is superior to PEGylation. *ACS Nano*, 2016, Vol. 10, Iss. 3, pp. 3267-3281.

Авторы:

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Тимганова В.П. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Храпцов П.В. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Ужвийук С.В. — инженер лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Шардина К.Ю. — инженер лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Authors:

Bochkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Timganova V.P., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Khrantsov P.V., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Uzhviyuk S.V., Engineer, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Shardina K.Yu., Engineer, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Нечаев А.И. — инженер лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Раев М.Б. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Заморина С.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Nechaev A.I., Engineer, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Raev M.B., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Zamorina S.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 08.05.2020
Принята к печати 11.05.2020

Received 08.05.2020
Accepted 11.05.2020

ПАРАМЕТРЫ НЕТОЗА У ПАЦИЕНТОВ С СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

Железко В.В., Новикова И.А.

УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

Резюме. Произведена оценка параметров нетоза в комплексе с другими проявлениями функциональной активности нейтрофилов крови у 34 пациентов с системной красной волчанкой (СКВ). Оценивали образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs) в культурах клеток, инкубированных в течение 30 и 150 минут в среде (спонтанный уровень; NET_{СП30} и NET_{СП150} соответственно) и в присутствии инактивированного нагреванием *S. aureus* (штамм ATCC 25923, количество микробных тел – 10⁸ КОЕ/мл) (стимулированный уровень; NET_{СТ30} и NET_{СТ150} соответственно). При этом за нейтрофильные внеклеточные ловушки принимали тонкие свободнолежащие внеклеточно расположенные фибриллярные структуры, в 2-3 раза превосходящие размер неизмененного гранулоцита. Результат выражали в процентах, как относительное количество внеклеточных ловушек на 100 сосчитанных лейкоцитов. Поглотительную активность нейтрофильных гранулоцитов оценивали в реакции фагоцитоза *S. aureus* с подсчетом процента нейтрофилов, поглотивших микробные частицы – фагоцитарный индекс (ФИ); среднего числа фагоцитированных объектов на один нейтрофил – фагоцитарное число (ФЧ). АФК-продуцирующую активность определяли в реакции восстановления нитросинего тетразолия в спонтанном и стимулированном *S. aureus* вариантах (НСТ_{СП} и НСТ_{СТ} соответственно), результат выражали как процент содержания формазан-положительных клеток на 100 сосчитанных лейкоцитов. Нитроксид-продуцирующие свойства определяли по методу Stow (1999) в спонтанных и стимулированных пробах по накоплению нитрированной аминокислоты тирозина (3-нитротирозина, 3-NT_{СП} и 3-NT_{СТ} соответственно).

Выявлены более низкие показатели АФК-продуцирующей, поглотительной и NO-образующей активности нейтрофилов на фоне повышенной способности к нетозу у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми лицами ($p < 0,05$). Активация нетоза отмечена в культурах клеток без стимуляции, что указывает на образование сетей *in vivo* при СКВ. Уровень NETs максимально выражен при наличии у пациентов люпус-нефрита ($p < 0,05$) и в период ремиссии заболевания ($p < 0,05$). Установлена зависимость параметров NET-образования от длительности и степени активности СКВ ($r_s = -0,6$; $p = 0,001$ и $r_s = 0,39$; $p = 0,02$ соответственно); титра аутоантител (anti-dsDNA и ANA; $r_s = 0,67$; $p = 0,047$ и $r_s = 0,59$; $p = 0,034$ соответственно), активности протромбинового комплекса ($r_s = 0,6$; $p = 0,036$) и уровней мочевины и креатинина ($r_s = 0,47$; $p = 0,037$ и $r_s = 0,39$; $p = 0,048$ соответственно).

Полученные данные свидетельствуют о том, что параметры NET-образования можно рассматривать как перспективный биомаркер для верификации диагноза СКВ, оценки клинической активности, тяжести заболевания и прогноза развития осложнений.

Ключевые слова: системная красная волчанка, нейтрофильные внеклеточные ловушки

Адрес для переписки:

Железко Вероника Владимировна
УО «Гомельский государственный медицинский университет»,
246000, Республика Беларусь, г. Гомель, ул. Ланге, 5.
Тел./факс: +375 (232) 35-98-38.
E-mail: veronikazhelezko@mail.ru

Address for correspondence:

Zhelezko Veronika V.
Gomel State Medical University
246000, Republic of Belarus, Gomel, Lange str., 5.
Phone/fax: +375 (232) 35-98-38.
E-mail: veronikazhelezko@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Железко, И.А. Новикова «Параметры нетоза у пациентов с системной красной волчанкой» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 987-992. doi: 10.15789/1563-0625-NIP-1978
© Железко В.В., Новикова И.А., 2020

For citation:

V.V. Zhelezko, I.A. Novikova "Netosis in patients with systemic lupus erythematosus", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 987-992. doi: 10.15789/1563-0625-NIP-1978
DOI: 10.15789/1563-0625-NIP-1978

NETOSIS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Zhelezko V.V., Novikova I.A.

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Abstract. The article presents the data on assessment of functional features of neutrophils in 34 patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Development of neutrophil extracellular traps (NETs) was evaluated in cell cultures incubated *in vitro* for 30 and 150 minutes (basal levels, NET_{BAS30} and NET_{BAS150}, respectively), and in the presence of heat-inactivated *S. aureus* (strain ATCC 25923, 10⁸ CFU/ml) (stimulated levels, NET_{ST30} and NET_{ST150}, respectively). NET looks like thin free-lying extracellular fibrillar structures, 2-3 times exceeding the size of unchanged granulocyte. The result was expressed as percentage and relative amount of extracellular traps per 100 counted leukocytes. Phagocytic activity of neutrophils was evaluated as phagocytosis of *S. aureus* by counting the percentage of neutrophils that engulfed phagocytic index of microbial particles (PI); the average number of phagocytosed objects per neutrophil phagocytic number (PC). ROS-producing activity was determined in the reduction of Nitroblue Tetrazolium tested in spontaneous and stimulated *S. aureus* variants (NBT_{BAS} and NBT_{ST}, respectively). The result was expressed as the percentage of formazan-positive cells per 100 white blood cells. Nitroxide-producing properties were determined using the Crow (1999) method in spontaneous and stimulated samples for the accumulation of the nitrated amino acid tyrosine (3-nitrotyrosine, 3-NT_{BAS}, and 3-NT_{ST}, respectively).

We revealed a decrease in ROS production, phagocytosis and NO-forming activity of neutrophils associated with increased netosis. Activation of the netosis was observed in cell cultures without stimulation, indicating the *in vivo* formation of networks in SLE. The NET increase is most pronounced in the patients with lupus nephritis ($p < 0.05$), and in remission of the disease ($p < 0.05$). We have revealed a correlation of NET formation parameters with duration and degree of SLE activity ($r_s = -0.6$; $p = 0.001$, and $r_s = 0.39$; $p = 0.02$, respectively); autoantibody titers (anti-dsDNA and ANA) ($r_s = 0.67$; $p = 0.047$ and $r_s = 0.59$; $p = 0.034$, respectively); prothrombin complex activity ($r_s = 0.6$; $p = 0.036$), as well and urea and creatinine levels ($r_s = 0.47$; $p = 0.037$ and $r_s = 0.39$; $p = 0.048$, respectively).

The parameters of NETs can be considered a promising biomarker for verifying the diagnosis of SLE, evaluation of clinical activity, disease severity, and predicting the development of complications.

Keywords: systemic lupus erythematosus, neutrophilic extracellular traps

Исследование было выполнено на следующих базах: кафедра клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет» (ректор – д.м.н., профессор А.Н. Лызиков); лаборатория клеточных технологий (зав. лабораторией – Н.И. Шевченко) и отделение иммунопатологии и аллергологии (зав. отделением – к.б.н. А.П. Саливончик) ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (директор – д.м.н., доцент А.В. Рожко); ревматологическое отделение (заведующая – Г.Г. Дундарова) Гомельской областной клинической больницы (главный врач – В.А. Бугаков).

The study was performed on the following bases: Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Allergology and Immunology, Gomel State Medical University (Rector, PhD, MD, Professor A.N. Lyzиков); Laboratory of Cell Technologies (Head, N.I. Shevchenko); Department of Immunology

and Allergology (Head, A.P. Salivonchic, PhD) at the Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology (Director, A.V. Rozhko, PhD, MD, Associate Professor); Rheumatology Department (Head, G.G. Dundarava) at the Gomel Regional Clinical Hospital (Head Physician, V.A. Bugakov).

Введение

Системная красная волчанка (СКВ) отличается большим разнообразием клинических форм и проявлений, что относит ее к одному из наиболее трудных в диагностике, мониторинге и прогнозировании течения заболеванию современной медицины. Исследования последних лет показывают важную роль нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в развитии и прогрессировании патологического процесса при СКВ [5]. Продемонстрировано, что нарушения в функциональной активности нейтрофилов носят разнонаправленный характер, выражающийся в повышении способ-

ности НГ к продукции активных форм кислорода (АФК) и угнетении поглотительной активности [3]. Одной из наименее изученных функций НГ является способность к высвобождению нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs). Предполагается, что компоненты NETs (белки-гистоны, нуклеиновые кислоты, ферменты) могут выступать факторами аутоагрессии и способствовать формированию аутоиммунного воспаления [7]. Более того, рядом авторов NETs рассматриваются как один из предикторов неблагоприятного течения аутоиммунных заболеваний (системная красная волчанка, микроскопический полиангиит) и развития осложнений [6]. Открытым также остается вопрос соотношения NET-образующих свойств нейтрофилов с другими проявлениями их функциональной активности и связи с клиническими особенностями заболевания.

Цель и задачи – оценить параметры нетоза в комплексе с другими проявлениями функциональной активности нейтрофилов крови у пациентов с СКВ.

Материалы и методы

Обследовано 34 пациента (33 женщины и 1 мужчина; возраст 17-53 лет) с диагнозом «СКВ». Диагноз верифицирован на основании клиники, лабораторных и инструментальных методов исследования и классификационных диагностических критериев (ACR, 1997). Оценка клинической активности проводилась согласно классификации В.А. Насоновой, а также в баллах согласно индексам SLEDAI2K, тяжесть необратимых повреждений внутренних органов – по индексу SLICC. Хронический тип течения СКВ был у 24 пациентов (70,6%), подострый у 5 (14,7%), острый у 5 (14,7%). Минимальная степень активности определена у 17 (50%), умеренная у 9 (26%) и высокая у 8 (24%) обследуемых. У 22 пациентов анализ изменений показателей проводился в динамике заболевания (обострение/ремиссия). Развитие заболевания сопровождалось возникновением поражения сердца – в 5 (15%), сосудов – в 7 (21%), легких – в 3 (9%), почек – в 18 (53%), кожи – в 7 (21%), ЖКТ – в 1 (3%), костно-мышечной системы – в 18 (53%), нервной системы – в 2 (6%) случаях.

Все пациенты принимали глюкокортикостероиды перорально в дозах от 2,5 до 15 мг/сут (Ме 5 мг/сут) в пересчете на преднизолон.

Материалом для исследования служила взвесь лейкоцитов, полученных путем отстаивания гепаринизированной крови (10 Ед/мл) и разведенных необходимым количеством фосфатно-солевого буфера (рН = 7,4) до концентрации НГ 5×10^6 клеток/мл. Жизнеспособность нейтрофи-

лов в тесте исключения трипанового синего составляла не менее 95%.

Образование внеклеточных ловушек НГ оценивали по методу И.И. Долгушина и соавт. (2010) в нашей модификации. Лейкоциты инкубировали в течение 30 и 150 минут при 37 °С в питательной среде RPMI-1640 (оценка спонтанного уровня, NET_{СП30}, NET_{СП150}) или в присутствии инактивированного нагреванием *S. aureus* в качестве стимулятора (оценка стимулированного уровня NET_{СТ30}, NET_{СТ150}). Подсчитывали не менее 200 НГ в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе под иммерсионным увеличением ($\times 1000$). При этом нейтрофильные внеклеточные ловушки представляли собой тонкие свободнолежащие, расположенные внеклеточно сетеподобные структуры. Результат подсчета выражали в процентах.

Поглотительную активность исследовали в реакции фагоцитоза (фагоцитарный индекс – ФИ, фагоцитарное число – ФЧ), АФК-продуцирующую активность определяли в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) по общепринятым методикам с микроскопической оценкой результата.

Нитроксид-продуцирующие свойства определяли по методу Crow (1999) в спонтанном и стимулированном тесте по накоплению 3-нитротирозина в плазме (3-NT_{СП} и 3-NT_{СТ} соответственно).

Контрольную группу составили 30 сопоставимых по полу и возрасту практически здоровых лиц. Группы сформированы на основании информированного согласия пациентов и здоровых лиц в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 2013 года.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Для количественных признаков, имеющих распределение, отличное от нормального, производилось вычисление медиан и интерквартильных интервалов – Ме Q_{0,25}-Q_{0,75}). Для оценки двух независимых групп по одному признаку применяли U-критерий Манна–Уитни. Сравнение двух зависимых выборок проводилось с использованием W-критерия Вилкоксона. Для изучения взаимосвязи двух признаков использовался корреляционный анализ по Спирмену (r_s). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Из таблицы 1 видно, что снижение резерва образования супероксидных радикалов и поглотительной активности, а также NO-продуцирующая способность НГ в ответ на стимуляцию у пациентов с СКВ была снижена относительно кон-

трольной группы ($p = 0,02$; $p < 0,05$ и $p < 0,05$ соответственно). Количество внеклеточных сетей у обследованных пациентов превышало значения здоровых лиц как при культивировании клеток в течение 30 минут, так и при 150-минутной инкубации ($p < 0,05$).

Известно, что формирование NETs может происходить с участием различных механизмов. «Суицидальный» путь образования нейтрофильных внеклеточных ловушек, осуществляющийся через активацию NADPH-оксидазы (кислород-зависимый путь), занимает от 2 до 4 часов, заключается в деконденсации хроматина, растворении цитоплазматических гранул с последующим распадом ядерной оболочки и специфическом лизисе НГ [8]. Другой путь, обозначаемый как «витальный» тип образования NETs, занимает от 5 до 60 минут, не сопровождается разрушением ядерной оболочки и растворением клетки и является кислород-независимым. Реализуется через упаковку фрагментов ДНК в везикулы, с последующей их транспортировкой через цитоплазму и выбросом хроматина в межклеточное пространство. НГ при этом становится безъядерной клеткой, способной к передвижению и захвату микроорганизмов [8]. С учетом имеющихся

сведений, полученный нами результат может свидетельствовать о повышении активности как витального, так и суицидального нетоза у пациентов с СКВ. Следует также подчеркнуть, что активация нетоза отмечена нами не только в ответ на стимуляцию (NET_{CT}), но и в культурах клеток без стимуляции (NET_{CTP}) (табл. 1), что указывает на образование сетей *in vivo* при СКВ. Триггером данного процесса может быть присутствующий в крови больных СКВ высокий уровень IFN α , который повышает чувствительность НГ к экстрезии NETs в организме [3, 5] и вырабатывается патологической субпопуляцией нейтрофилов – гранулоцитами низкой плотности (low-density neutrophils, LDGs) [7]. Такая функциональная неоднородность, возможно, обуславливает обратную взаимосвязь между параметрами NET-образования с другими изученными нами проявлениями функциональной активности НГ в группе пациентов (поглотительной, NO- и АФК-продуцирующей активностью): $r_s = -0,38$; $p = 0,002$; $r_s = -0,41$ $p < 0,005$ и $r_s = -0,22$; $p = 0,048$ соответственно. Кроме того, одним из индукторов нетоза могут выступать аутоантитела [4], что в нашем исследовании нашло отражение в установленных взаимосвязях между показателями

ТАБЛИЦА 1. ПАРАМЕТРЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НГ У ПАЦИЕНТОВ С СКВ, Me Q_{0,25}-Q_{0,75}

TABLE 1. PARAMETERS OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF NG IN PATIENTS WITH SLE, Me Q_{0,25}-Q_{0,75}

Параметр, единицы измерения Parameter, units of measurement	Доноры Donors (n = 30)	Пациенты с СКВ Patients with SLE (n = 34)
NET _{CT30} , % NET _{BAS30} , %	2,5 (2,0-3,0)	5,0 (4,0-7,0)*
NET _{CT30} , % NET _{ST30} , %	5,0 (3,0-6,0)	10,5 (7,0-13,0)*
NET _{CT150} , % NET _{BAS150} , %	5,0 (3,0-6,0)	9,0 (7,0-11,0)*
NET _{CT150} , % NET _{ST150} , %	7,0 (5,0-8,0)	13,0 (10,0-15,0)*
НСТ _{CT} , % NBT _{BAS} , %	11,5 (10,0-14,0)	12,0 (8,0-17,0)
НСТ _{CT} , % NBT _{ST} , %	48,5 (46,0-54,0)	42,5 (39,0-55,0)*
ФИ, % PI, %	72,5 (68,0-76,0)	57,0 (52,0-66,0)*
ФЧ PC	7,0 (7,0-8,0)	5,5 (5,0-7,0)*
3-NT _{CT} , (мМ/л) ⁻¹ 3-NT _{BAS} , (мМ/л) ⁻¹	17,0 (14,6-19,1)	16,9 (13,0-21,4)
3-NT _{CT} , (мМ/л) ⁻¹ 3-NT _{ST} , (мМ/л) ⁻¹	22,9 (21,4-25,2)	16,8 (11,3-22,0)*

Примечание. * – различия значимы в сравнении с группой доноров ($p < 0,050$; U-критерий Манна-Уитни).

Note. * – the differences are significant in comparison with the donor group ($p < 0.050$; Mann-Whitney U test).

NETs, титром антиядерных АТ (ANA) и антител к двуспиральной ДНК (anti-dsDNA) ($r_s = 0,67$; $p = 0,047$ и $r_s = 0,59$; $p = 0,034$ соответственно).

Имеются сообщения, что нейтрофильные внеклеточные ловушки являются факторами активации свертывающей системы крови [3], тогда как оксид азота обуславливает вазодилатацию и торможение процессов агрегации и адгезии тромбоцитов [1]. Выявленная нами обратная взаимосвязь между показателями нетоза и NO-продуцирующей активностью лейкоцитов указывает на то, что в условиях активации нетоза создаются предпосылки для усугубления патологических процессов в сосудистом русле, что подтверждается наличием прямой взаимосвязи между количеством NETs у пациентов с СКВ и активностью протромбинового комплекса ($r_s = 0,6$; $p = 0,036$).

Снижение резерва образования супероксидных радикалов и поглотительной активности нейтрофилов у пациентов с СКВ (табл. 1) может быть обусловлено эффектом ГКС, длительно принимаемых пациентами [2]. Сопоставление групп пациентов, принимающих ГКС в низких (< 7,5 мг/сут в пересчете на преднизолон, $n = 7$) и средних дозах (от 7,5 до 30 мг/сут в пересчете на преднизолон, $n = 5$) продемонстрировали отсутствие различий по количеству нейтрофильных внеклеточных сетей ($p > 0,05$). Не обнаружено также различий показателей нетоза у пациентов, получающих лечение ГКС в течение года ($n = 6$, $p > 0,05$) и более одного года ($n = 5$, $p > 0,05$).

У 22 пациентов с СКВ мы провели анализ изменений функциональных параметров нейтрофилов в динамике воспалительного процесса (обострение/ремиссия) (рис. 1). При этом четко видно, что при переходе в период ремиссии происходит дальнейшее повышение показателей нетоза ($p = 0,01$; $p = 0,03$) относительно периода обострения, но только в спонтанном тесте, что служит дополнительным подтверждением активации процессов образования NETs непосредственно в организме пациентов.

Учитывая, что компоненты нейтрофильных внеклеточных ловушек (гистоны, содержимое гранул, нити ядерной ДНК и пр.) являются факторами аутоагрессии и провоцируют образование аутоантител [7], данный факт следует рассматривать как фактор дальнейшего прогрессирования заболевания. Так, рядом авторов показано, что повышенное образование экстрацеллюлярных сетей на фоне нарушенной их деградации у пациентов с СКВ является предиктором развития волчаночного нефрита [4]. Проведенный нами анализ характера изменений параметров NET-образования у пациентов с нефритом ($n = 18$) и без него ($n = 16$) позволил установить более высокие значения NETs ($p < 0,05$) при люпус-нефрите, причем различия выявлялись только при инкубации лейкоцитов в среде без стимулятора ($NET_{СП30}$, $NET_{СП150}$). На момент включения в исследование у обследованных пациентов уровень поражения почек соответствовал 1-2-й стадии хронической почечной болезни (KDIGO 2012);

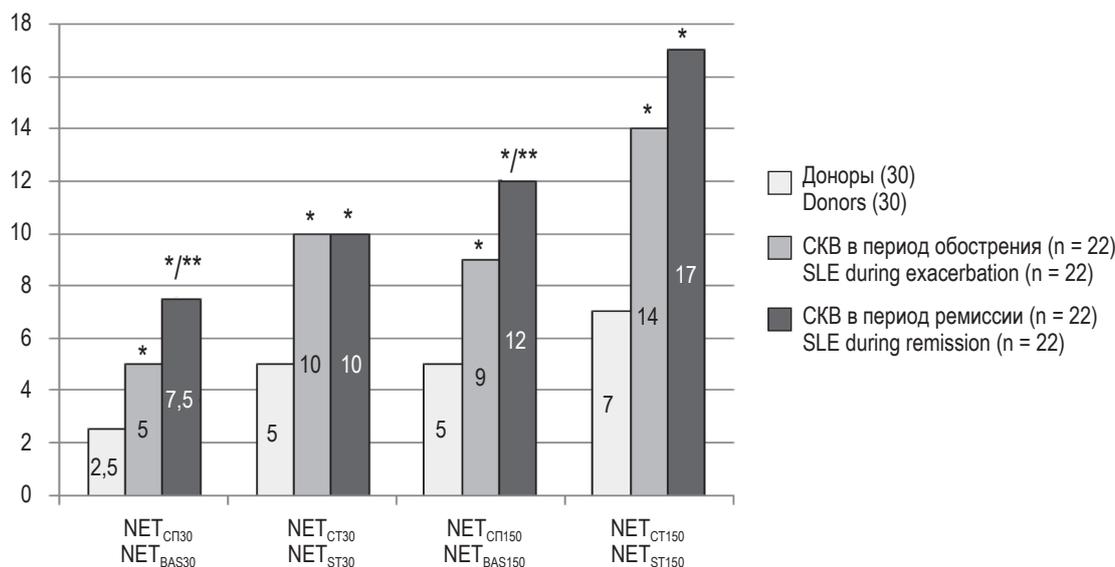


Рисунок 1. Нетоз у пациентов СКВ в динамике воспалительного процесса

Примечание. * – различия значимы в сравнении с группой доноров; ** – различия значимы при сравнении групп пациентов ($p < 0,05$; W-критерий Вилкоксона).

Figure 1. Netosis in SLE patients in the dynamics of the inflammatory process

Note. *, differences are significant in comparison with the group of donors; **, differences are significant when comparing groups of patients ($p < 0,05$; Wilcoxon W criterion).

нами выявлена взаимосвязь между способностью к образованию нейтрофильных ловушек с одной стороны и содержанием мочевины и креатинина с другой ($r_s = 0,47$; $p = 0,037$ и $r_s = 0,39$; $p = 0,048$ соответственно).

Нами также проведен анализ особенностей нетотической активности нейтрофилов и клинических особенностей заболевания, который установил, что степень повышения параметров NET-образования зависит от длительности и степени активности СКВ ($r_s = -0,6$; $p = 0,001$ и $r_s = 0,39$; $p = 0,02$ соответственно).

Выводы

1. У пациентов с СКВ повышена спонтанная и стимулированная способность нейтрофилов крови к образованию внеклеточных сетей NADPH-зависимым и NADPH-независимым

способами ($p < 0,05$). Параметры нетоза были обратно взаимосвязаны с поглотительной, NO- и АФК-продуцирующей активности НГ ($r_s = -0,38$; $p = 0,002$, $r_s = -0,41$; $p < 0,005$ и $r_s = -0,22$; $p = 0,048$ соответственно).

2. Степень повышения параметров NET-образования зависела от периода заболевания (в ремиссии выше NET_{СП30} $p = 0,01$ и NET_{СП150} $p = 0,03$ соответственно), длительности и степени активности СКВ ($r_s = -0,6$; $p = 0,001$ и $r_s = 0,39$; $p = 0,02$ соответственно), наличия люпус-нефрита ($p < 0,05$).

3. Установлена зависимость параметров нетоза от титра аутоантител (anti-dsDNA и ANA) ($r_s = 0,67$; $p = 0,047$ и $r_s = 0,59$; $p = 0,034$ соответственно), активности протромбинового комплекса ($r_s = 0,6$; $p = 0,036$) и уровней мочевины и креатинина ($r_s = 0,47$; $p = 0,037$ и $r_s = 0,39$; $p = 0,048$ соответственно).

Список литературы / References

1. Осякова А.О., Тихомирова И.А. Сосудистые факторы регуляции и их влияние на реологические свойства крови // Ярославский педагогический вестник, 2010. № 4. С. 89-92. [Oslyakova A.O., Tikhomirova I.A. Vascular regulation factors and their effect on the rheological properties of blood. *Yaroslavskiy pedagogicheskiy vestnik = Yaroslavl Pedagogical Bulletin*, 2010, no. 4, pp. 89-92. (In Russ.)]
2. Решетняк Т.М., Середавкина Н.В., Дыдыкина И.С., Насонов Е.Л. Глюкокортикоиды в терапии системной красной волчанки // Клиницист, 2013. Т. 3, № 4. С. 14-26. [Reshetnyak T.M., Seredavkina N.V., Dudykina I.S., Nasonov E.L. Glucocorticoids in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Klinicist = Clinician*, 2013, Vol. 3, no. 4, pp. 14-26. (In Russ.)]
3. Смирнова Е.В., Краснова Т.Н., Проскурнина Е.В., Мухин Н.А. Роль дисфункции нейтрофилов в патогенезе системной красной волчанки // Терапевтический архив, 2017. № 12. С. 110-113. [Smirnova E.V., Krasnova T.N., Proskurnina E.V., Mukhin N.A. The role of neutrophil dysfunction in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2017, Vol. 12, pp. 110-113. (In Russ.)]
4. Hakkim A., Fürnrohr B.G., Amann K., Laube B., Abed U.A., Brinkmann V., Herrmann M., Voll R.E., Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, pp. 9813-9818.
5. Kaplan M.J. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2011, Vol. 7, pp. 691-699.
6. Knight J.S., Carmona-Rivera C., Kaplan M.S. Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 380. doi: 10.3389/fimmu.2012.00380.
7. Kusworini H., Benny A.P., Radhitio A.N. 1,25(OH)₂D₃ inhibits endothelial apoptosis by neutrophil extracellular traps externalization in systemic lupus erythematosus patients. *Turk. J. Immunol.*, 2017, Vol. 5, no. 3, pp. 89-95.
8. Yipp B.G., Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*, 2013, Vol. 122, no. 16, pp. 2784-294.

Авторы:

Железко В.В. — ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

Новикова И.А. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

Authors:

Zhelezko V.V., Assistant Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Allergology and Immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Novikova I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Allergology and Immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Поступила 22.03.2020

Отправлена на доработку 06.05.2020

Принята к печати 11.05.2020

Received 22.03.2020

Revision received 06.05.2020

Accepted 11.05.2020

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ САРКОИДОЗЕ

Лазарева Н.М.¹, Баранова О.П.¹, Кудрявцев И.В.^{1,2}, Арсентьева Н.А.³,
Любимова Н.Е.³, Сесь Т.П.¹, Илькович М.М.¹, Тотолян Арег А.^{1,3}

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

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

³ ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Саркоидоз — это воспалительное заболевание неизвестной этиологии с поражением легких и других органов, в которых формируются характерные гранулемы без признаков некроза. При этом происходит активация клеток иммунной системы, в частности Т-лимфоцитов, и продукция широкого спектра цитокинов. Целью данного исследования явилось изучение особенностей цитокинового профиля плазмы крови больных саркоидозом. Были исследованы образцы плазмы периферической крови больных саркоидозом (n = 52). Контролем служили образцы периферической крови, полученные от 22 практически здоровых лиц. Определялся уровень 46 цитокинов (пг/мл): IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IFN α 2, IFN γ , TNF α , TNF β , IL-1Ra, IL-10, EGF, FGF-2, Flt3 Ligand, G-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF α , VEGF-A, sCD40L, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL11, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CX3CL1. Обнаружено достоверно повышенное содержание интерлейкинов и некоторых провоспалительных цитокинов: IL-3 — 0,70 против 0,20, p = 0,003; IL-4 — 14,37 против 3,15, p = 0,009; IL-5 — 1,06 против 0,89, p < 0,001; IL-12 (p70) — 1,27 против 0,56, p = 0,028; IL-17A — 1,48 против 0,43, p < 0,001; IFN α 2 — 41,79 против 25,04, p = 0,003; IFN γ — 4,13 против 1,14, p < 0,001; TNF α — 21,67 против 6,70, p < 0,001; противовоспалительного цитокина IL-10: 1,03 против 0,45, p = 0,019; ростовых факторов: FGF-2 — 40,08 против 30,58, p = 0,008, G-CSF — 24,18 против 8,21, p = 0,006 и VEGF-A — 42,52 против 26,76, p = 0,048; хемокинов: CCL3 — 3,86 против 1,33, p < 0,001; CCL17 — 78,24 против 26,24, p < 0,001; CCL20 — 7,19 против 5,64, p = 0,021; CCL22 — 660,60 против 405,00, p < 0,001; CXCL9 — 4013 против 1142, p < 0,001; CXCL10 — 565,90 против 196,60, p < 0,001; CXCL11 — 230,20 против 121,10, p = 0,018; CX3CL1 — 56,99 против 5,16, p < 0,001. Концентрации хемокина CCL11 у больных относительно группы условно здоровых достоверно снижены: 77,58 против 124,70, при p = 0,022. Выявление особенностей цитокинового профиля у больных саркоидозом может свидетельствовать об их важной роли в процессах формирования и исходов гранулем. А также требует дополнительного более детального изучения, сопоставления с фенотипами, вариантами течения и исхода заболевания.

Ключевые слова: саркоидоз, цитокины, хемокины, ростовые факторы, плазма крови

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Н.М. Лазарева, О.П. Баранова, И.В. Кудрявцев,
Н.А. Арсентьева, Н.Е. Любимова, Т.П. Сесь,
М.М. Илькович, Арег А. Тотолян «Особенности
цитокинового профиля при саркоидозе» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 993-1002.
doi: 10.15789/1563-0625-FOC-2064

© Лазарева Н.М. и соавт., 2020

For citation:

N.M. Lazareva, O.P. Baranova, I.V. Kudryavtsev,
N.A. Arsentieva, N.E. Liubimova, T.P. Ses', M.M. Ilkovich,
Areg A. Totolian "Features of cytokine profile in patients with
sarcoidosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 993-1002.
doi: 10.15789/1563-0625-FOC-2064

DOI: 10.15789/1563-0625-FOC-2064

FEATURES OF CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH SARCOIDOSIS

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

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

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

^c St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Sarcoidosis is an inflammatory disease of unknown etiology with damage to the lungs and other organs characterized by development of necrosis-free epithelioid cell granulomas. Granulomatous inflammation characterized by the activation of different immune systems cells, in particular T lymphocytes, and the cytokines production. Our study was aimed at investigating the characteristics of the cytokine profile of blood plasma in patients with sarcoidosis. We studied peripheral blood plasma samples of patients with sarcoidosis (n = 52). The control blood samples were taken from healthy volunteers (n = 22). The level of 46 cytokines (pg/ml) was determined, as follows: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IFN α 2, IFN γ , TNF α , TNF β , IL-1ra, IL-10, EGF, FGF-2, Flt3 Ligand, G-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB / BB, TGF α , VEGF-A, sCD40L, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL11, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CX3CL1. Significantly higher levels of interleukins and some proinflammatory cytokines were found in the patients with sarcoidosis, i.e., IL-3, 0.70 vs 0.20, p = 0.003; IL-4, 14.37 vs 3.15, p = 0.009; IL-5, 1.06 vs 0.89, p < 0.001; IL-12 (p70), 1.27 vs 0.56, p = 0.028; IL-17A, 1.48 vs 0.43, p < 0.001; IFN α 2, 41.79 vs 25.04, p = 0.003; IFN γ , 4.13 vs 1.14, p < 0.001; TNF α , 21.67 vs 6.70, p < 0.001; anti-inflammatory cytokine IL-10, 1.03 vs 0.45, p = 0.019; growth factors: FGF-2, 40.08 vs 30.58, p = 0.008, G-CSF, 24.18 vs 8.21, p = 0.006, and VEGF-A, 42.52 vs 26.76, p = 0.048; chemokines: CCL3, 3.86 vs 1.33, p < 0.001; CCL17, 78.24 vs 26.24, p < 0.001; CCL20, 7.19 vs 5.64, p = 0.021; CCL22, 660.60 vs 405.00, p < 0.001; CXCL9, 4013 vs 1142, p < 0.001; CXCL10, 565.90 vs 196.60, p < 0.001; CXCL11, 230.20 vs 121.10, p = 0.018; CX3CL1, 56.99 vs 5.16, p < 0.001. Peripheral blood chemokine CCL11 levels were significantly lower in patients compared to the group of healthy volunteers: 77.58 vs 124.70, p = 0.022. The features of the cytokine profile in patients with sarcoidosis may indicate their important role in the processes of formation and outcomes of granulomas. These issues require an additional detailed study, comparison with phenotypes, differential course and outcomes of the disease.

Keywords: sarcoidosis, cytokines, chemokines, growth factors, peripheral blood plasma

Введение

Саркоидоз является мультисистемным воспалительным заболеванием неизвестной этиологии, характеризующийся образованием гранул без признаков некроза, Т-лимфоцитарной инфильтрацией, продукцией цитокинов, играющих важную роль в иммунопатогенезе заболевания. Образование гранул при саркоидозе чаще происходит в легких, лимфатических узлах бронхопальмональных групп, реже поражаются другие органы (лимфатические узлы иной локализации, кожа, глаза, суставы, сердце, нервная система и другие) [2, 14, 22].

Известно, что Т-хелперы 1 типа (Th1) активируют макрофаги, которые синтезируют провоспалительные цитокины, хемокины, факторы бактерицидности. Это приводит к стимуляции воспалительного каскада, а образование грануле-

мы происходит в результате изменения архитектуры пораженной ткани, привлечения клеток в очаг воспаления из сосудистого русла и локальной пролиферации клеток. Первоначально саркоидоз описывался как заболевание, связанное с активацией Th1-звена, по причине высокой местной экспрессии цитокинов: IFN γ , TNF α , IL-12 и IL-18, которые являются патогенетически важными в индукции образования и поддержания гранул [12, 15, 19, 22].

Помимо этого, в формировании гранул принимают участие Th17 и разные «пластичные» их варианты и продуцируемые ими цитокины, IL-17A, IL-22, IFN γ . Также в составе гранул могут присутствовать цитотоксические CD8⁺Т-лимфоциты, Т-регуляторные клетки, В-лимфоциты, фибробласты [12, 21, 22].

Изучение хемотаксических цитокинов – хемокинов, рекрутирующих разные клетки из кро-

вотока и привлекающих их в очаг воспаления также является актуальным. Это способствует пониманию механизмов направленной миграции клеток-эффекторов иммунного ответа из периферической крови в пораженные органы и ткани. Особенный интерес представляют хемокины, привлекающие Th1, Th2, Th17, фолликулярные Т-хелперы (Tfh), Т-регуляторные клетки, В-лимфоциты.

Дополнительное изучение цитокинов – маркеров ангиогенеза, факторов роста является важным в понимании процессов формирования, созревания и исхода гранулемообразования при саркоидозе. Факторы ангиогенной активности участвуют в различных этапах физиологических и патологических процессов, таких как пролиферация, созревание и выживание клеток, формировании новых кровеносных сосудов, миграции клеток в очаг воспаления из периферической крови.

Следовательно, для изучения иммунопатогенеза саркоидоза и более полного понимания его механизмов важна роль не только различных клеток, но и продуцируемых ими цитокинов.

Цель исследования – изучить особенности цитокинового профиля плазмы крови больных саркоидозом.

Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием К₃ЭДТА.

Всего было обследовано 52 больных саркоидозом в возрасте 20-67 лет, не получавших иммуносупрессивную терапию, в том числе системные кортикостероиды, и плазмаферез. Все больные саркоидозом проходили обследование на базе клиники НИИ интерстициальных и орфанных заболеваний легких при ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, у 94% больных диагноз был подтвержден с помощью гистологического исследования.

В качестве группы сравнения использовали образцы периферической крови 22 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными саркоидозом.

Все исследования были проведены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

В плазме крови измеряли содержание цитокинов (пг/мл) методом мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex). Определялся уровень 46 цитокинов: интерлейкины и некоторые провоспалительные цитокины (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IFN α 2, IFN γ , TNF α , TNF β /Lymphotoxin- α (LTA)); противовоспалительные цитокины (IL-1Ra, IL-10); ростовые факторы (EGF, FGF-2/FGF-basic, Flt3 Ligand, G-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF α , VEGF-A); другие растворимые факторы (sCD40L); хемокины (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL17/TARC, CCL20/MIP-3 α , CCL22/MDC, CXCL1/GRO, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL13/BCA-1, CX3CL1/Fractalkine).

Использовались коммерческие тест-системы “Milliplex MAP” (Millipore) (США) с применением магнитных микросфер “Milliplex Mag” (США), согласно инструкциям фирмы-производителя. Регистрацию и анализ данных проводили на приборе “Luminex MAGPIX” (Luminex) (США).

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакетов программ Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 5.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США).

Полученные результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Для сравнения выборок полученных данных использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, а также корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции r-Спирмена.

Результаты

Значения концентраций 46 исследованных цитокинов в плазме крови больных саркоидозом относительно группы условно здоровых добровольцев подробно представлены в таблицах 1 и 2.

Среди всех определяемых интерлейкинов и некоторых провоспалительных цитокинов в образцах больных относительно условно здоровых лиц отмечалось достоверно значимое повышение концентраций следующих цитокинов: IL-3 – 0,70 против 0,20, p = 0,003; IL-4 – 14,37 против 3,15, p = 0,009; IL-5 – 1,06 против 0,89, p < 0,001; 1,03 против 0,45, p = 0,019; IL-12 (p70) – 1,27 против 0,56, p = 0,028; IL-17A/CTLA8 – 1,48 против 0,43, p < 0,001; IFN α 2 – 41,79 против 25,04, p = 0,003; IFN γ – 4,13 против 1,14, p < 0,001; TNF α – 21,67 против 6,70, p < 0,001 (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ (пг/мл) У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ (n = 52) И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ (n = 22), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. PERIPHERAL BLOOD PLASMA LEVELS OF CYTOKINES (pg/ml) IN PATIENTS WITH SARCOIDOSIS (n = 52) AND HEALTHY VOLUNTEERS (n = 22), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокины Cytokines	Концентрация в плазме крови, пг/мл Peripheral blood plasma levels, pg/ml		Значимость различий (p) Statistically significant (p)
	Саркоидоз Sarcoidosis (n = 52)	Условно здоровые добровольцы Healthy volunteers (n = 22)	
Интерлейкины и некоторые провоспалительные цитокины Interleukins and some proinflammatory cytokines			
IL-1 α	29,74 (18,28-124,10)	386,60 (38,75-734,40)	p = 0,274
IL-1 β	3,04 (1,18-10,63)	7,45 (0,58-14,69)	p = 0,391
IL-2	1,53 (0,72-2,67)	0,89 (0,54-1,83)	p = 0,177
IL-3	0,70 (0,36-1,58)	0,20 (0,12-0,53)	p = 0,003**
IL-4	14,37 (3,66-27,62)	3,15 (0,01-11,71)	p = 0,009**
IL-5	1,06 (0,95-1,31)	0,89 (0,81-0,98)	p < 0,001***
IL-6	< 3,2	< 3,2	
IL-7	3,91 (2,04-5,69)	2,59 (1,58-4,46)	p = 0,279
IL-9	< 3,2	< 3,2	
IL-12 (p40)	11,86 (3,95-28,41)	12,76 (0,36-17,20)	p = 0,633
IL-12 (p70)	1,27 (0,56-2,02)	0,56 (0,23-1,27)	p = 0,028*
IL-13	8,58 (3,00-75,91)	3,69 (0,65-210,00)	p = 0,613
IL-15	1,08 (0,29-2,87)	0,29 (0,16-2,48)	p = 0,334
IL-17A/CTLA8	1,48 (0,44-3,26)	0,43 (0,15-1,17)	p < 0,001***
IFN α 2	41,79 (33,98-74,43)	25,04 (13,81-33,98)	p = 0,003**
IFN γ	4,13 (2,70-6,85)	1,14 (0,29-2,28)	p < 0,001***
TNF α	21,67 (12,58-30,34)	6,70 (3,39-10,64)	p < 0,001***
TNF β /Lymphotoxin- α (LTA)	< 3,2	< 3,2	

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Цитокины Cytokines	Концентрация в плазме крови, пг/мл Peripheral blood plasma levels, pg/ml		Значимость различий (p) Statistically significant (p)
	Саркоидоз Sarcoidosis (n = 52)	Условно здоровые добровольцы Healthy volunteers (n = 22)	
Противовоспалительные цитокины Anti-inflammatory cytokines			
IL-1ra	31,77 (12,13-80,95)	25,11 (11,37-59,08)	p = 0,383
IL-10	1,03 (0,45-2,91)	0,45 (0,28-1,09)	p = 0,019*
Ростовые факторы Growth factors			
EGF	15,36 (8,870-33,110)	17,08 (11,84-34,28)	p = 0,594
FGF-2/FGF-basic	40,08 (30,58-69,39)	30,58 (0,01-42,00)	p = 0,008**
Flt3 Ligand	12,02 (8,288-22,730)	12,81 (8,51-22,05)	p = 0,984
G-CSF	24,18 (13,17-46,38)	8,21 (2,424-19,860)	p = 0,006**
GM-CSF	9,47 (4,281-16,430)	4,87 (4,28-11,43)	p = 0,260
PDGF-AA	1340 (724,90-2635,00)	1008 (550,50-2355,00)	p = 0,315
PDGF-AB/BB	9301 (4639-14504)	9328 (6207-17389)	p = 0,496
TGF α	2,01 (0,86-4,92)	1,76 (0,95-4,03)	p = 0,221
VEGF-A	42,52 (26,76-74,91)	26,76 (13,80-47,69)	p = 0,048*
Другие растворимые факторы Other soluble factors			
sCD40L	767,50 (407,90-1765,00)	711 (461,9-1713,0)	p = 0,887

Примечание. Значимость различий: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001.

Note. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

В образцах плазмы крови больных саркоидозом в сравнении с образцами практически здоровых добровольцев отмечалось достоверно повышенное содержание некоторых хемокинов. Среди СС-хемокинов: CCL3/MIP-1 α – 3,86 против 1,33, p < 0,001; CCL17/TARC – 78,24 против 26,24, p < 0,001; CCL20/MIP-3 α – 7,19 против 5,64, p = 0,021; CCL22/MDC – 660,60 против 405,00, p < 0,001. Концентрация хемокина

CCL11/Eotaxin оказалась достоверно ниже в группе больных и составила 77,58 против 124,70, при p = 0,022. Отмечалось достоверно повышенное содержание СХС-хемокинов в плазме крови больных: CXCL9/MIG – 4013 против 1142, p < 0,001; CXCL10/IP-10 – 565,90 против 196,60, p < 0,001; CXCL11/I-TAC – 230,20 против 121,10, p = 0,018, а также представителя СХ3С-хемокинов – CX3CL1/Fractalkine – 56,99 про-

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ ХЕМОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ (пг/мл) У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ (n = 52) И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ (n = 22), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. PERIPHERAL BLOOD PLASMA LEVELS OF CHEMOKINES (pg/ml) IN PATIENTS WITH SARCOIDOSIS (n = 52) AND HEALTHY VOLUNTEERS (n = 22), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокины Cytokines	Концентрация в плазме крови, пг/мл Peripheral blood plasma levels, pg/ml		Значимость различий (p) Statistically significant (p)
	Саркоидоз Sarcoidosis (n = 52)	Условно здоровые добровольцы Healthy volunteers (n = 22)	
СС-хемокины CC-chemokines			
CCL2/MCP-1	226,60 (163,10-299,30)	218,70 (151,30-316,50)	p = 1,000
CCL3/MIP-1α	3,86 (2,96-5,34)	1,33 (0,16-1,92)	p < 0,001***
CCL4/MIP-1β	17,83 (9,21-27,75)	14,62 (0,00-23,37)	p = 0,120
CCL5/RANTES	26955 (13909-58637)	18943 (15138-40316)	p = 0,404
CCL7/MCP-3	11,52 (7,39-82,32)	86,44 (10,74-162,10)	p = 0,475
CCL11/Eotaxin	77,58 (46,43-115,00)	124,70 (70,33-153,40)	p = 0,022*
CCL17/TARC	78,24 (35,72-167,40)	26,24 (13,28-49,55)	p < 0,001***
CCL20/MIP-3α	7,19 (5,64-12,61)	5,64 (3,84-9,66)	p = 0,021*
CCL22/MDC	660,60 (417,40-914,60)	405,00 (287,50-508,00)	p < 0,001***
СХС-хемокины CXC-chemokines			
CXCL1/GRO	333,80 (164,20-941,80)	349,70 (94,56-578,60)	p = 0,285
CXCL8/IL-8	6,76 (3,06-26,65)	19,98 (3,22-126,00)	p = 0,158
CXCL9/MIG	4013 (1859-7688)	1142 (584,70-1616,00)	p < 0,001***
CXCL10/IP-10	565,90 (362,30-771,70)	196,60 (119,30-249,40)	p < 0,001***
CXCL11/I-TAC	230,20 (149,20-469,10)	121,10 (76,23-259,50)	p = 0,018*
CXCL13/BCA-1	53,20 (33,32-90,88)	31,94 (21,32-62,69)	p = 0,081
СХ3С-хемокины CX3C-chemokines			
CX3CL1/Fractalkine	56,99 (5,16-108,30)	5,16 (0,00-35,53)	p < 0,001***

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

тив 5,16, $p < 0,001$. Уровни CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CXCL1/GRO, CXCL8/IL-8, CXCL13/BCA-1 в представленных группах достоверно не отличались (табл. 2).

Среди ростовых факторов у больных саркоидозом отмечалось достоверно повышенное содержание FGF-2/FGF-basic (40,08 против 30,58, при $p = 0,008$), G-CSF (24,18 против 8,21, при $p = 0,006$) и VEGF-A (42,52 против 26,76, при $p = 0,048$) (табл. 1).

Концентрации цитокинов IL-6, IL-9, TNF β /Lymphotoxin- α (LTA) и в той, и в другой группе оказались за пределами уровня детекции прибора ($< 3,2$ пг/мл).

Обсуждение

Ранее нами был проведен анализ содержания некоторых популяций и субпопуляций Т- и В-лимфоцитов при саркоидозе. Описано содержание на разных стадиях дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов, особенностей состава регуляторных Т-лимфоцитов, а также изменение субпопуляционного состава В-лимфоцитов в периферической крови больных саркоидозом при разной степени активности заболевания [1, 4, 5, 6, 7]. Известно, что направленную миграцию клеток в ткани обеспечивают лиганды для определенных рецепторов, экспрессирующихся на клеточной мембране. Полученные нами данные могут свидетельствовать не только о важности изучения субпопуляций клеток, но и продуцируемых ими цитокинов, а также цитокинов, привлекающих клетки в очаг гранулематозного воспаления. Это важно для определения патогенетически важных цитокинов для индукции формирования, поддержания и исходов гранулем. В том числе и в сравнении с особенностями клинического течения, активности саркоидоза, системности поражения и исходов заболевания.

Саркоидоз является Th1-опосредованным заболеванием, что определяется повышением синтеза IFN γ Т-хелперами в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ), а также присутствием цитокинов, направляющих дифференцировку наивных Т-хелперов в сторону Th1, IL-12 и IL-18, как в гранулематозной ткани, так и в БАЛ. В последнее время в иммунопатогенезе рассматривается не только изолированная роль Th1, а комбинация Th1- и Th17-ассоциированных факторов в развитии и прогнозе заболевания. Соответственно, и продуцируемых ими цитокинов. Кроме того, обнаружены «пластичные» Th17, способные к изолированной или сочетанной продукции IL-17A и/или IFN γ . Также описаны различия в участии Th17 как при остром дебюте саркоидоза (син-

дроме Лефгрена), так и при хроническом дебюте заболевания [12, 15, 22]. В результате нашего исследования в плазме больных саркоидозом отмечалось достоверно повышенное содержание IL-12 (p70), IL-17A/CTLA8, IFN γ .

При саркоидозе описывается роль и изменение концентраций IFN γ зависимых хемокинов: CXCL9/MIG (от англ. monokine induced by gamma-interferon); CXCL10/IP-10 (от англ. interferon-induced protein of 10 kDa); CXCL11/I-TAC (от англ. interferon inducible T cell alpha chemoattractant). Они взаимодействуют с CXCR3 рецепторами на поверхности клеток и обеспечивают хоуминг CD4⁺Т-лимфоцитов и моноцитов в очаг поражения для дальнейшего формирования гранулем [13, 18, 19, 25]. Экспрессировать CXCR3 способны также «пластичные» Th17, цитотоксические CD8⁺Т-лимфоциты, ряд субпопуляций Т-регуляторных клеток, В-лимфоциты, натуральные киллеры, дендритные клетки, а также клетки эпителия и эндотелия [3, 11, 16, 21, 22]. Эти хемокины также участвуют в процессах ангиогенеза и пролиферации клеток при саркоидозе [8, 23]. Полученные нами данные свидетельствуют о повышенном содержании всех трех IFN γ зависимых хемокинов в образцах крови больных саркоидозом.

По данным литературы, у больных саркоидозом отмечается повышение уровней CXCL9, CXCL10, CXCL11. Хемокин CXCL10 принимает участие в механизмах формирования гранулем при саркоидозе и может быть использован в качестве дополнительного диагностического и прогностического показателя тяжелого течения заболевания. Повышение концентрации хемокина CXCL11 в периферической крови и в БАЛ у больных саркоидозом коррелировало со снижением показателей функции внешнего дыхания, а, следовательно, ухудшением течения заболевания [9, 21, 22, 24].

Это может свидетельствовать о важности дальнейшего более детального изучения роли данных хемокинов в иммунопатогенезе саркоидоза, при различных вариантах течения заболевания, особенностей клинической картины, исхода и прогноза заболевания.

Хемокины CCL17/TARC (от англ. thymus and activation-regulated chemokine) и CCL22/MDC (от англ. macrophage-derived chemokine) привлекают из кровотока в очаг воспаления Т-хелперы, несущие на своей поверхности хемокиновый рецептор CCR4, который экспрессируется Th2; регуляторными Т-лимфоцитами [10, 17]. Отмечается, что концентрация хемокина CCL17/TARC достоверно повышена в сыворотке крови больных саркоидозом по сравнению с практически здоровыми лицами. Также отмечается более тяжелое

течение заболевания, его активность и системное гранулематозное поражение органов у пациентов с высоким уровнем данного хемокина [17]. Полученные нами результаты свидетельствуют, что содержание данных хемокинов в плазме крови больных оказалось достоверно выше группы условно здоровых добровольцев. Но помимо это, отмечалось повышенное содержание и других СС-хемокинов.

Из числа исследованных ростовых факторов у больных саркоидозом отмечалось достоверно повышенное содержание FGF-2/FGF-basic (от англ. basic fibroblast growth factor), G-CSF (от англ. granulocyte-colony stimulating factor), VEGF-A (от англ. vascular endothelial growth factor A). Это может свидетельствовать о роли данных цитокинов в процессах формирования гранул при саркоидозе, привлечении клеток в очаг воспаления и

вариантах исхода гранулемообразования в рассасывание или фиброз.

Некоторые ростовые факторы могут быть повышены как у больных саркоидозом, так и идиопатическим легочным фиброзом. Проангиогенный фактор VEGF и профибротический фактор FGF-2 могут способствовать прогрессированию саркоидоза. Их содержание достоверно повышено у пациентов с сниженными значениями диффузионной способности легких [20, 26, 27].

Выявление особенностей цитокинового профиля у больных саркоидозом требует дополнительного более детального изучения. Необходимо сопоставление уровней цитокинов у больных с разными фенотипами заболевания (острый и хронический саркоидоз), вариантами течения и исхода заболевания. Что важно не только для известных патогенетически значимых цитокинов, но и хемокинов, а также факторов роста.

Список литературы / References

1. Баранова О.П., Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. Цитотоксические Т-лимфоциты при хроническом течении саркоидоза // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 4. С. 605-608. [Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A. Cytotoxic T lymphocytes in chronic sarcoidosis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 4, pp. 605-608. (In Russ.)]
2. Илькович М.М. Интерстициальные и орфанные заболевания легких. М.: GEOTAR-Media, 2016. 560 с. [Ilkovich M.M. Interstitial and orphan lung diseases]. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 560 p.
3. 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., Krobinec 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.
4. Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. Особенности экспрессии CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами при саркоидозе // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 329-334. [Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Baranova O.P., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A. CD57 expression by peripheral blood cytotoxic T cells in sarcoidosis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 3, pp. 329-334. (In Russ.)]
5. Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Баранова О.П., Головкин А.С., Исаков Д.В., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. Экспрессия CD39 регуляторными Т-лимфоцитами при хроническом и остром саркоидозе // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 467-478. [Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Baranova O.P., Golovkin A.S., Isakov D.V., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A. CD39⁺ expression by regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis and Lofgren's syndrome. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 467-478. (In Engl.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-467-478.
6. Лазарева Н.М., Кудрявцев И.В., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. Субпопуляционный состав цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови при саркоидозе // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 348-353. [Lazareva N.M., Kudryavtsev I.V., Baranova O.P., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A. Peripheral blood cytotoxic T cells in patients with sarcoidosis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 3, pp. 348-353. (In Russ.)]
7. Лазарева Н.М., Кудрявцев И.В., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. Анализ субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови больных саркоидозом при разной степени активности заболевания // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1081-1098. [Lazareva N.M., Kudryavtsev I.V., Baranova O.P., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A. Peripheral blood B cell subsets from patients with various activity of chronic sarcoidosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1081-1098. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1081-1098.

8. Aksoy M.O., Yang Y., Ji R., Reddy P.J., Shahabuddin S., Litvin J., Rogers T.J., Kelsen S.G. CXCR3 surface expression in human airway epithelial cells: cell cycle dependence and effect on cell proliferation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2006, Vol. 290, no. 5, pp. 909-918.
9. Arger N.K., Ho M.E., Allen I.E., Benn B.S., Woodruff P.G., Koth L.L. CXCL9 and CXCL10 are differentially associated with systemic organ involvement and pulmonary disease severity in sarcoidosis. *Respir. Med.*, 2020, Vol. 161, 105822. doi: 10.1016/j.rmed.2019.105822.
10. d'Ambrosio D., Albanesi C., Lang R., Girolomoni G., Sinigaglia F. and Laudanna C. Quantitative differences in chemokine receptor engagement generate diversity in integrin-dependent lymphocyte adhesion. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, pp. 2303-2312.
11. Garcia-Lopez M.A., Sanchez-Madrid F., Rodriguez-Frade J.M., Mellado M., Acevedo A., Garcia M.I., Albar J.P., Martinez C., Marazuela M. CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells. *Lab. Invest.*, 2001, Vol. 81, pp. 409-418.
12. Greaves S.A., Atif S.M., Fontenot A.P. Adaptive immunity in pulmonary sarcoidosis and chronic beryllium disease. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 474. doi: 10.3389/fimmu.2020.00474.
13. Groom J.R., Luster A.D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.*, 2011, Vol. 89, no. 2, pp. 207-215.
14. Kobak S. Sarcoidosis: a rheumatologist's perspective. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.*, 2015, Vol. 7, no. 5, pp. 196-205.
15. Miedema J.R., Kaiser Y., Broos C.E., Wijsenbeek M.S., Grunewald J., Kool M. Th17-lineage cells in pulmonary sarcoidosis and Löfgren's syndrome: friend or foe? *J. Autoimmun.*, 2018, Vol. 87, pp. 82-96.
16. Muehlinghaus G., Cigliano L., Huehn S., Peddinghaus A., Leyendeckers H., Hauser A.E. Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells. *Blood*, 2005, Vol. 105, pp. 3965-3971.
17. Nguyen C.T.H., Kambe N., Ueda-Hayakawa I., Kishimoto I., Ly N.T.M., Mizuno K., Okamoto H. TARC expression in the circulation and cutaneous granulomas correlates with disease severity and indicates Th2-mediated progression in patients with sarcoidosis. *Allergol. Int.*, 2018, Vol. 67, no. 4, pp. 487-495.
18. Nishioka Y., Manabe K., Kishi J., Wang W., Inayama M., Azuma M., Sone S. CXCL9 and 11 in patients with pulmonary sarcoidosis: a role of alveolar macrophages. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 149, pp. 317-326.
19. Nureki S., Miyazaki E., Ando M., Ueno T., Fukami T., Kumamoto T., Sugisaki K., Tsuda T. Circulating levels of both Th1 and Th2 chemokines are elevated in patients with sarcoidosis. *Respir. Med.*, 2008, Vol. 102, no. 2, pp. 239-247.
20. Piotrowski W.J., Kiszalkiewicz J., Górski P., Antczak A., Górski W., Pastuszek-Lewandoska D., Migdalska-Sęk M., Domańska-Senderowska D., Nawrot E., Czarnecka K.H., Kurmanowska Z., Brzezińska-Lasota E. Immunoexpression of TGF- β /Smad and VEGF-A proteins in serum and BAL fluid of sarcoidosis patients. *BMC Immunol.*, 2015, Vol. 16, 58. doi: 10.1186/s12865-015-0123-y.
21. Ragusa F. Sarcoidosis and Th1 chemokines. *Clin. Ter.*, 2015, Vol. 166, no. 1, pp. 72-76.
22. Sakthivel P., Bruder D. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2017, Vol. 24, no. 1, pp. 59-65.
23. Strieter R.M., Burdick M.D., Gomperts B.N., Belperio J.A., Keane M.P. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2005, Vol. 16, no. 6, pp. 593-609.
24. Su R., Nguyen M.L., Agarwal M.R., Kirby C., Nguyen C.P., Ramstein J., Darnell E.P., Gomez A.D., Ho M., Woodruff P.G., Koth L.L. Interferon-inducible chemokines reflect severity and progression in sarcoidosis. *Respir. Res.*, 2013, Vol. 14, 121. doi: 10.1186/1465-9921-14-121.
25. Torraca V., Cui C., Boland R., Bebelman J.P., van der Sar A.M., Smit M.J., Siderius M., Spaink H.P., Meijer A.H. The CXCR3-CXCL11 signaling axis mediates macrophage recruitment and dissemination of mycobacterial infection. *DMM*, 2015, Vol. 8, no. 3, pp. 253-269.
26. Tuleta I., Biener L., Pizarro C., Nickenig G., Skowasch D. Proangiogenic and profibrotic markers in pulmonary sarcoidosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2018, Vol. 1114, pp. 57-66.
27. Ziora D., Jastrzębski D., Adamek M., Czuba Z., Kozielski J.J., Grzanka A., Kasperska-Zajac A. Circulating concentration of markers of angiogenic activity in patients with sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med.*, 2015, Vol. 15, 113. doi: 10.1186/s12890-015-0110-3.

Авторы:

Лазарева Н.М. – старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Lazareva N.M., Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Баранова О.П. — к.м.н., старший научный сотрудник Научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких, доцент кафедры пульмонологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; заведующий лабораторией иммунорегуляции, отдел иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Арсентьева Н.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Любимова Н.Е. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Сесь Т.П. — д.б.н., профессор, профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Илькович М.М. — д.м.н., профессор, директор Научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких, заведующий кафедрой пульмонологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; директор ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Baranova O.P., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Interstitial and Orphan Lung Diseases, Associate Professor, Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Arsentieva N.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Liubimova N.E., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Ses' T.P., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Ilkovich M.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Interstitial and Orphan Lung Diseases, Head, Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 28.05.2020
Принята к печати 15.06.2020

Received 28.05.2020
Accepted 15.06.2020

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ГИПОКСИИ И ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Полозова Э.И., Пузанова Е.В., Сеськина А.А.

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Резюме. Целью нашей работы явилась оценка взаимосвязи иммунных нарушений, гипоксии и воспаления при артериальной гипертензии (АГ) в условиях метаболических нарушений. Клиническое исследование включало 117 пациентов, рандомизированных на группы согласно протоколу исследования, в возрасте от 30 до 62 лет, обратившихся за амбулаторной помощью или проходивших периодические медицинские осмотры на базе ГБУЗ РМ «Республиканская клиническая больница № 5» г. Саранска. Группа контроля включала 25 практически здоровых лиц, не имеющих признаков метаболического синдрома (МС) и повышения артериального давления. Группа сравнения состояла из 47 пациентов с АГ I-II степени с поражением органов мишеней, но не имевших ассоциированных клинических состояний согласно проведенным обследованиям. Основная группа включала 45 пациентов с достигнутой I-II степенью АГ при обращении на фоне гипотензивной терапии с поражением органов мишеней и признаками МС с случайным сочетанием его компонентов, но без ассоциированных клинических состояний. Пациенты основной группы и группы сравнения получали гипотензивную терапию согласно стандартам и клиническим рекомендациям по ведению пациентов с АГ, состоящую из комбинации одного из блокаторов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, диуретика и/или дигидропидинового блокатора кальциевых каналов. В плазме крови испытуемых оценивали цитокиновый профиль, показатели гипоксии и неспецифического воспаления. Проведенные исследования показали, что у пациентов с АГ, не имеющих метаболические нарушения и при сочетании АГ с метаболическим синдромом, отмечается сдвиг цитокинового профиля в сторону повышения про- и противовоспалительного звена, что указывает на формирование дисбаланса в иммунорегуляторной системе. Наблюдалось развитие гипоксических изменений в сыворотке крови, что подтверждалось ростом содержания молочной и пировиноградной кислот в данных группах больных. В условиях формирования данной патологии гипоксия выступает в качестве модулятора иммунного и неспецифического воспаления. Повышение показателей неспецифического вялотекущего воспаления коррелирует с развитием необратимых изменений в органах, ассоциированных с АГ, прогрессированием атеросклероза и ускорением кардиометаболического континуума. В совокупности эти нарушения определяют патогенетические механизмы повреждения, возникающие при сочетании АГ и МС, и являются взаимоотягивающим фактором наряду с активацией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, метаболический синдром, патогенез, цитокиновый дисбаланс, гипоксия, неспецифическое воспаление, сердечно-сосудистые события

Адрес для переписки:

Полозова Элла Ивановна
Национальный исследовательский Мордовский
государственный университет
имени Н.П. Огарева
430000, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск,
ул. Димитрова, 35, кв. 67.
Тел.: 8 (927) 174-05-31.
E-mail: ellanac78@mail.ru

Address for correspondence:

Polozova Ella I.
Ogarev Mordovia State University
430000, Russian Federation, Republic of Mordovia, Saransk,
Dimitrov str., 35, apt 67.
Phone: 7 (927) 174-05-31.
E-mail: ellanac78@mail.ru

Образец цитирования:

Э.И. Полозова, Е.В. Пузанова, А.А. Сеськина
«Взаимосвязь иммунологических нарушений, гипоксии
и воспаления при артериальной гипертензии
и метаболическом синдроме» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 1003-1008.
doi: 10.15789/1563-0625-RBI-2059
© Полозова Э.И. и соавт., 2020

For citation:

E.I. Polozova, E.V. Puzanova, A.A. Seskina "Relationship
between immunological alterations, hypoxia and inflammation
in arterial hypertension combined with metabolic syndrome",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 5, pp. 1003-1008.
doi: 10.15789/1563-0625-RBI-2059
DOI: 10.15789/1563-0625-RBI-2059

RELATIONSHIP BETWEEN IMMUNOLOGICAL ALTERATIONS, HYPOXIA AND INFLAMMATION IN ARTERIAL HYPERTENSION COMBINED WITH METABOLIC SYNDROME

Polozova E.I., Puzanova E.V., Seskina A.A.

Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Abstract. Our study was aimed at assessing a relationship between immune system alterations, hypoxia and inflammation in arterial hypertension (AH) coupled to metabolic disturbances. A total of 117 patients were enrolled into clinical study, having been randomized into groups in accordance with study protocol, aged 30 to 62 years. They sought care in outpatient setting or underwent periodic health examination at the Republican Clinical Hospital №5, Saransk, Mordovia, Russia. A control group contained 25 apparently healthy subjects lacking signs of metabolic syndrome (MS) and elevated arterial pressure. A comparison group contained 47 patients with AH grade I-II featured with damaged target organs, but lacking associated relevant clinical manifestations, as based on the assay data. The main group contained 45 patients receiving antihypertensive therapy with overt AH grade I-II verified upon medical consultation coupled to damaged target organs and MS signs with its randomly combined components, but lacking associated clinical manifestations. The patients from main and comparison groups received antihypertensive therapy in accordance with approved guidelines and clinical recommendations for management of AH patients consisting of one of renin-angiotensin-aldosterone system blockers, diuretic and/or dihydropyridine calcium channel blocker. Cytokine profile, level of hypoxia and non-specific inflammation were measured in blood serum. The data obtained demonstrated that AH patients with/without metabolic syndrome were noted to display cytokine profile shifted towards elevated pro- and anti-inflammatory immune arm pointing at imbalanced immune regulation. Hypoxic changes were also found in blood serum that was confirmed by elevated level of lactic and pyruvic acid in these groups. Moreover, development of such pathology was coupled to hypoxia which served as a modulator of immune-related and non-specific inflammation. Rise of non-specific low-grade inflammation correlates developing irreversible AH-associated changes in organs, progression of atherosclerosis and accelerated cardio-metabolic continuum. Altogether, such alterations underlie pathogenetic mechanisms of tissue damage emerging upon AH and MS being mutually aggravating factor along with activated renin-angiotensin-aldosterone system.

Keywords: arterial hypertension, metabolic syndrome, pathogenesis, cytokine imbalance, hypoxia, non-specific inflammation, cardiovascular events

Introduction

Arterial hypertension (AH) defined as a chronic disease featured with elevated blood pressure without identifying overt causes has moved far beyond global pandemic. Its epidemiology does not depend neither on social status being found at similar rate in high-, middle- and low-income countries, nor on sex identity reaching up to 47 and 40% in males and females under 60, respectively, equalized, however, after age over 60 affecting more than 60% of subjects [1, 2]. Sedentary lifestyle and obesity related to diverse metabolic disorders are the most valuable risk factors for cardiovascular events in aging human population [3, 4, 5].

Current population-wide studies starkly demonstrate significant relationship between immune imbalance markers and inflammatory parameters in patients with elevated blood pressure and metabolic disorders. Changes in cytokine network showed significant positive correlation with increased vascular stiffness and lowered elasticity in AH patients underlying pathogenetic role for cytokinemia. In particular, pro-inflammatory cytokines (tumor

necrosis factor (TNF), interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8) are able to induce development of endothelial dysfunction. TNF in chronic diseases may also contribute to developing insulin resistance and dyslipidemia, whereas IL-6 acting via TNF and IL-1 elicits endothelial dysfunction being a potential triggering agent for acute coronary events [6, 7, 8].

Previously, it was shown that level of fibrinogen, C-reactive protein (CRP) and neopterin was increased in inflammatory events, which serve as sensitive markers for inflammation and necrosis. Their rise in the serum higher than reference values correlates with increased risk of complications in cardiovascular diseases [9, 10].

Hypoxia developing in AH patients under pathological conditions due to metabolic syndrome (MS) contributes to activated lipid peroxidation (LPO) and production of copious amount of pro-inflammatory cytokines involved in developing adaptation to hypoxia [11, 12].

Elevated serum level of AH-coupled pro-inflammatory markers, hypoxia-related components, cytokine imbalance in combination with MS evidence

about significance of such homeostatic arms in disease pathogenesis.

Currently available publications lack data on relation between hypoxia, parameters of immune imbalance and altered components of non-specific inflammation in AH patients with metabolic disorders.

Our study was aimed at examining a relationship between immunological disturbances, hypoxia and inflammation in combination with arterial hypertension and metabolic syndrome.

Materials and methods

Clinical study was conducted in the outpatient-polyclinic unit of the State Budgetary Healthcare Institution Republic of Mordovia Republican Clinical Hospital No. 5, City of Saransk, Russia. There were enrolled 117 patients randomized into groups in accordance with study protocol. Control group contained 25 apparently healthy subjects (15 males and 10 females aged 30 to 45 years) lacking signs of metabolic syndrome and elevated blood pressure (BP).

A comparison group contained 47 patients (26 males and 21 females, aged 32 to 58 years) with AH grade I-II featured with damaged target organs, but lacking associated clinical manifestations based on surveillance data. The main group contained 45 patients (19 males and 26 females, aged 37 to 62 years) receiving antihypertensive therapy with overt AH grade I-II verified upon medical consultation and coupled to damaged target organs and MS signs with its randomly combined components, but lacking associated clinical manifestations. Patients from main and comparison groups received antihypertensive therapy in accordance with approved guidelines and clinical recommendations for management of AH patients consisting of one of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) blockers, diuretic and/or dihydropyridine calcium channel blocker.

Serum cytokine profile was assessed by using ELISA Microplate Analyser (Personal Lab, Italy) with ELISA reagent kits (Vector-Best, Novosibirsk, Russia; BIOHIT, Helsinki, Finland; DRG, Germany).

Intensity of serum hypoxia was measured by level of pyruvic acid (Pyr) during the reaction in 2,4-dinitrophenylhydrazine assay (Kushmanova O.D., Ivchenko G.M., 1983) and lactic acid (LA) in the reaction with paraoxydiphenyl (Menshov V.V., 1987).

Automatic biochemical analyzer ABX Pentra 400 (France) was used to measure glucose, total cholesterol (TCH), triglycerides (TG), low- and high-density lipoproteins (LDL and HDL), uric acid (LA) in the serum after an overnight fast to check for metabolic syndrome.

Serum pro-inflammatory changes were assessed by measuring level of high-sensitivity C-reactive protein (CRP, Protein Complex LLC, St. Petersburg). Fibrinogen concentration was measured by Clauss

chrometric method on coagulation analyzer (Tehnologia Standart, Barnaul, Russia). Neopterin concentration was measured by ELISA (Concile GmbH, USA).

Cytokine profile, hypoxia level, and concentration of pro-inflammatory markers were measured upon initial medical consultation, and the data obtained from 25 control volunteers were considered as parameter normal range.

Statistical processing of study data was performed by using routine statistics software Microsoft Office XP and Excel by calculating arithmetic mean (M), error of mean (m), as well as significance value by using Student's t-test (significance is set at $p < 0.05$). An inter-parameter relationship was assessed by measuring a correlation coefficient r .

Results and discussion

Initially, serum cytokine profile was assessed in patients from the three groups by using ELISA. It was found that both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine level was elevated in the main and comparison groups, whereas in control group they were within the reference range.

Next, hypoxia level was measured. It was shown that lactate level was higher than the reference range solely in the main group, whereas pyruvate level was increased both in the main and comparison groups vs control group being within the normal range.

After that, intensity of non-specific inflammation was assessed. In particular, neopterin level did not exceed reference range in any group, whereas it tended to rise in the main and comparison groups. CRP and neopterin levels were higher than normal range in the main group.

According to the neuro-humoral theory, RAAS blockade lowers cardiovascular risk by 23% suggesting about importance of additional mechanisms in development of cardiovascular events. Uncovering etiopathogenesis as well as blockade of additional mechanisms particularly immune-related cues results in overall decrease in sudden vascular events.

Examining patients from comparison group (group II) and main group (group III) revealed elevated pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF α . Cytokine profile in various groups is shown in Table 1. Level of IL-1 β in group II was significantly elevated by 237% ($p < 0.001$) compared to control (group I), whereas IL-6 – by 120% ($p < 0.001$), IL-8 – by 42% ($p < 0.01$), and TNF α – by 22% ($p < 0.05$).

Most prominently rise in cytokine level was shown in AH + MS patients vs control group (group III vs I). In particular, amount of IL-1 β was significantly increased by 349% ($p < 0.001$), IL-6 – by 162% ($p < 0.001$), IL-8 – by 191% ($p < 0.001$), and TNF α – by 59% ($p < 0.001$) compared to control group.

Comparing cytokine profile in group III (main group) vs group II (AH patients), they were significantly

TABLE 1. LEVEL OF SERUM CYTOKINES IN VARIOUS PATIENT GROUPS (M±m)

Parameters	Reference range	Groups	Study data	p-value
IL-1β, pg/ml	< 5	I	3.21±0.18	D I-II < 0.001 D I-III < 0.001 D II-III < 0.05
		II	10.70±1.3	
		III	14.43±1.21	
IL-6, pg/ml	< 7	I	4.60±0.38	D I-II < 0.001 D I-III < 0.001 D II-III>0.05
		II	10.15±1.4	
		III	12.07±0.65	
IL-8, pg/ml	< 62	I	17.4±1.13	D I-II < 0.01 D I-III < 0.001 D II-III < 0.001
		II	24.8±1.91	
		III	50.7±1.8	
IL-10, pg/ml	< 9.1	I	8.5±0.66	D I-II < 0.001 D I-III < 0.001 D II-III < 0.01
		II	15.1±0.18	
		III	18.2±0.83	
TNFα, pg/ml	0-8.21	I	6.76±0.28	D I-II < 0.05 D I-III < 0.001 D II-III < 0.005
		II	8.27±0.50	
		III	10.81±0.31	

Note. I, control group; II, comparison group; III, main group. D I-II, significant differences in group I vs II; D I-III, significant differences in group I vs III; D II-III, significant differences in group II vs III.

TABLE 2. SERUM HYPOXIA PARAMETERS AND INFLAMMATION MARKERS IN PATIENT GROUPS (M±m)

Parameters	Reference range	Groups	Study data	p-value
Lactate, mmol/g protein	0.5-2.2	I	1.79±0.07	D I-II > 0.05 D I-III < 0.005 D II-III < 0.01
		II	1.93±0.06	
		III	2.27±0.09	
Pyruvate, mmol/g protein	0.08-0.16	I	0.11±0.01	D I-II < 0.005 D I-III < 0.001 D II-III < 0.01
		II	0.17±0.01	
		III	0.22±0.01	
Neopterin, nmol/l	< 10	I	2.68±0.03	D I-II < 0.005 D I-III < 0.001 D II-III < 0.01
		II	3.95±0.31	
		III	5.23±0.28	
C-reactive protein, mg/l	< 5	I	0.16±0.01	D I-II < 0.01 D I-III < 0.001 D II-III < 0.001
		II	1.52±0.06	
		III	5.16±0.31	
Fibrinogen, g/l	2.00-4.00	I	2.41±0.01	D I-II > 0.05 D I-III < 0.001 D II-III < 0.005
		II	2.68±0.34	
		III	4.6±0.07	

Note. I, control group; II, comparison group; III, main group. D I-II, significant differences in group I vs II; D I-III, significant differences in group I vs III; D II-III, significant differences in group II vs III.

elevated: IL-1β – by 34% (p < 0.05), IL-8 – by 104% (p < 0.001), TNFα – by 30% (p < 0.005). However, no significant changes in IL-6 level were found.

Moreover, we found a significant increase in concentration of anti-inflammatory cytokine IL-10 in group II vs control group by 75% (p < 0.001) and in group III – by 114% (p < 0.001), respectively. Comparing parameters in group I vs II, revealed that they differed by 20% (p < 0.01), which might

suggest their production in response to hypoxia. Sharply elevated level of anti-inflammatory cytokine IL-10 points at development of compensatory anti-inflammatory defense to chronic hypoxia emerging upon AH progression, especially in case of metabolic disorders.

Cytokines (IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα) belong to primary broad-range humoral pro-inflammatory cytokines which trigger production of the secondary

messenger of low-grade inflammation such fibrinogen, C-reactive protein, and neopterin (Table 2). It was shown that in group II (AH patients) vs group I (control) serum samples was significantly higher by 8.5-fold ($p < 0.01$) and neopterin – by 47% ($p < 0.005$). No significant changes in fibrinogen level in these groups were found. Most prominently, parameters of non-specific inflammation were increased in AH + MS patients (group III). In particular, CRP level was elevated by 31.2-fold ($p < 0.001$), neopterin – by 95% ($p < 0.001$), and fibrinogen – by 90% ($p < 0.001$) compared to healthy volunteers. Comparing AH (group II) vs AH + MS patients (group III) also revealed significantly increased parameters in the latter group: CRP – by 239% ($p < 0.001$), fibrinogen – by 71% ($p < 0.005$), neopterin – by 32% ($p < 0.01$). Although neopterin level did not exceed the reference range in AH (group II) vs AH + MS (group III), it was significantly increased as compared to that one found in healthy volunteers and taken as arbitrary normal interval for patients lacking MS and elevated BP. It was found that neopterin level higher than reference range was observed in viral infections. Upon that, in case it was increased within the reference range it might evidence about subclinical low-grade inflammation in AH + MS patients.

Thus, a biochemical profile observed by us evidences about cascade immune reactions in AH + MS patients resulting in accelerated development of cardiometabolic continuum, which likely become augmented in hypoxia due to end-products able to modulate pro-inflammatory immune response. The level of hypoxia-related parameters is shown in Table 2. In particular, serum samples were found to contain hypoxia-related marker lactate elevated by 26% ($p < 0.005$) in AH + MS patients (group III) vs healthy volunteers (group I) as well as by 17% ($p < 0.01$) in group III compared to AH patients

lacking metabolic disturbances. Pyruvate level was elevated by 54% ($p < 0.005$) in AH patients (group II) and by 100% ($p < 0.001$) in AH + MS patients (group III) compared to healthy volunteers (group I) that was also significantly higher in AH patients exhibiting metabolic disturbances compared to group II.

Conclusion

Thus, our study revealed that immune imbalance, chronic hypoxia and inflammation play a pivotal role in structure of AH pathogenesis particularly in case of metabolic disturbances. Elevated amount of pro- and anti-inflammatory cytokines in hypoxia suggests about developing imbalance in immune regulation, proving that hypoxia serves as a predictor of chronic inflammation. Such pathogenetic mechanisms undoubtedly exert mutually aggravating effects upon disease progression, which is further confirmed by revealed correlation between parameters related to immune disturbances and elevated parameters of non-specific inflammation. Moreover, we were able to uncover a positive correlation between parameters related to hypoxia and non-specific inflammation, as well as immune disturbances and hypoxia. It is of special importance by giving deeper insights into understanding pathogenetic mechanisms behind AH progression during metabolic disturbances as well as development of various cardiovascular events.

Differences in cytokine profile, non-specific inflammation in hypoxia evidence about severity of homeostatic disturbances in AH patients and more profound changes in AH + MS patients that correlate with intensity of damage in target organs and development of vascular catastrophe. A combined influence on arms of AH progression along with RAAS blockade may retard irreversible processes in organs and tissues related to AH.

Список литературы / References

1. Boytsov S.A., Balanova Yu.A., Shalnova S.A., Deev A.D., Artamonova G.V., Gatagonova T.M., Duplyakov D.V., Efanov A.Yu., Zhernakova Yu.V., Konradi A.O., Libis R.A., Minakov A.V., Nedogoda S.V., Oshchepkova E.V., Romanchuk S.A., Rotar O.P., Trubacheva I.A., Chazova I.E., Shlyakhto E.V., Muromtseva G.A., Evstifeeva S.E., Kapustina A.V., Konstantinov V.V., Oganov R.G., Mamedov M.N., Baranova E.I., Nazarova O.A., Shutemova O.A., Furmenko G.I., Babenko N.I., Azarin O.G., Bondartsov L.V., Khvostikova A.E., Ledyeva A.A., Chumachek E.V., Isaeva E.N., Basyrova I.R., Kondratenko V.Yu., Lopina E.A., Safonova D.V., Skripchenko A.E., Indukaeva E.V., Cherkass N.V., Maksimov S.A., Danilchenko Y.V., Mulerova T.A., Shalaev S.V., Medvedeva I.V., Shava V.G., Storozhok M.A., Tolparov G.V., Astakhova Z.T., Toguzova Z.A., Kaveshnikov V.S., Karpov R.S., Serebryakova V.N. Arterial hypertension in subjects aged 25-64 years: prevalence, awareness, treatment and control. Based on ESSAY study data. *Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2014, Vol. 13, no. 4, pp. 4-14. (In Russ.)
2. Bulaeva N.I., Golukhova E.Z. Endothelial dysfunction and oxidative stress: a role in developing cardiovascular pathology. *Creative Cardiology*, 2013, no. 1, pp. 14-22. (In Russ.)
3. Clinical recommendations. Arterial hypertension in adulthood (Electronic resource). Russian Society of Cardiology. Approved year: 2020. Access mode: https://scardio.ru/content/Guidelines/Clinic_rek_AG_2020.pdf.
4. Markov Kh.M. Molecular mechanisms of dysfunctional vascular endothelium. *Cardiology*, 2005, no. 12, pp. 62-67. (In Russ.)
5. Polozova E.I., Puzanova E.V., Seskina A.A. A role of immunological alterations, endothelial dysfunction and hemostatic disturbances in generation of arterial hypertension in metabolic syndrome. *Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 221-230. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-ROI-1926.
6. Prevalence of risk factors for non-infectious diseases in 2012-2013 Russia-wide population. ESSAY study data. *Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2014, Vol. 13, no. 6, pp. 4-11. (In Russ.)

7. Sergeeva V.V., Rodionova A.Yu. Contemporary approach to assess arterial hypertension combined with metabolic disturbances. *Arterial Hypertension*, 2013, Vol. 19, no. 5, pp. 397-404. (In Russ.)
8. Sumerkina V.A., Chulkov V.I.S., Chulkov V.S., Ozhigina E.V. Status of hemostasis system and cytokine profile in patients with metabolic syndrome (in Russian). *Kazan Medical Journal*, 2015, Vol. 96, no. 5, pp. 728-734. (In Russ.)
9. Timasheva Ya.R. Immunological aspects of essential hypertension. *Medical immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 407-418. (In Russ.)
10. Chukaeva I.I., Orlova N.V., Khavka N.N., Klepikova M.V. Examining inflammatory factors in patients with metabolic syndrome. *Metabolic Syndrome. Medicine*, 2010, Vol. 4, pp. 50-56. (In Russ.)
11. Caillon A., Schiffrin E.L. Role of inflammation and immunity in hypertension: recent epidemiological, laboratory, and clinical evidence. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2016, Vol. 18, no. 3, 21. doi: 10.1007/s11906-016-0628-7.
12. Ehret G.B., Caulfield M.J. Genes for blood pressure: an opportunity to understand hypertension. *Eur. Heart J.*, 2013, Vol. 34, pp. 951-961.
13. Williams B., Mancia G., Spiering W. et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur. Heart J.*, 2018, Vol. 39, Iss. 33, pp. 3021-3104.

Авторы:

Полозова Э.И. — д.м.н., доцент, профессор кафедры госпитальной терапии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Пузанова Е.В. — аспирант кафедры госпитальной терапии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Сеськина А.А. — аспирант кафедры госпитальной терапии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Authors:

Položova E.I., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Hospital Therapy, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Puzanova E.V., Postgraduate Student, Department of Hospital Therapy, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Seskina A.A., Postgraduate Student, Department of Hospital Therapy, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Поступила 24.05.2020
Принята к печати 26.05.2020

Received 24.05.2020
Accepted 26.05.2020

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *IL4-589C>T*, *FCGR2A-166His>Arg*, *DEFB1-20G>A*, *DEFB1-52G>A* НА СОДЕРЖАНИЕ $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-4$ И $IL-10$ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНЫМ ОСТЕОАРТРОЗОМ ТАЗОБЕДРЕННЫХ СУСТАВОВ

Мироманов А.М., Забелло Т.В., Мироманова Н.А.

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ,
г. Чита, Россия

Резюме. Цель исследования – изучить влияние полиморфизма генов *IL4-589C>T*, *FCGR2A-166His>Arg*, *DEFB1-20G>A*, *DEFB1-52G>A* на содержание $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-4$ и $IL-10$ при первичном остеоартрозе тазобедренных суставов. Проведено обследование 100 пациентов русской национальности с первичным коксартрозом III-IV стадии (средний возраст $61,3\pm 8,5$ лет), проживающих в Забайкальском крае. Контрольная группа ($n = 100$) – резиденты сопоставимые по возрасту ($60\pm 8,3$ лет), полу, месту проживания и национальности. Критерии исключения: наличие родственных связей; другие виды остеоартрозов (посттравматические, ревматоидные, метаболические и пр.); диспластические синдромы и фенотипы; острые и хронические воспалительные заболевания в стадии обострения; сахарный диабет; остеопороз; сосудистые заболевания; ожирение; злокачественные новообразования; злоупотребление алкоголем. В работе использованы следующие методы исследования: клинические; лабораторные (иммунологический – определение $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-4$, $IL-10$; генетический (с помощью полимеразной цепной реакции; для исследования выбрана точечная мутация гена *IL4* в позиции 589(C>T), *FCGR2A* в позиции 166(His>Arg), *DEFB1* в позиции 20(G>A) и 52(G>A); материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из периферической крови больных); инструментальные (рентгенография). Исследования осуществляли при поступлении пациентов в стационар. Статистическая обработка данных проведена при помощи пакета программ STATISTICA 6.1 (StatSoft, США), Microsoft Office Excel 2019 for Windows 10. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Наличие генотипа -589T/T полиморфизма гена *IL4-589C>T* опосредованно способствует более высокому содержанию $TNF\alpha$ и $IL-1\beta$ при первичном остеоартрозе тазобедренных суставов. У пациентов с генотипом -166Arg/Arg регистрируется более высокая концентрация таких цитокинов, как $TNF\alpha$ и $IL-1\beta$ (в 1,3 раза) по сравнению с генотипом -166His/Arg и напротив, низкое содержание $IL-4$ и $IL-10$ (в 1,3 раза) в сопоставлении с генотипом

Адрес для переписки:

Мироманов Александр Михайлович
ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ
672000, Россия, Забайкальский край, г. Чита,
ул. Горького, 39а.
Тел.: 8 (924) 386-18-16.
Факс: 8 (3022) 32-30-58.
E-mail: miromanov_a@mail.ru

Address for correspondence:

Miromanov Alexander M.
Chita State Medical Academy
672000, Russian Federation, Chita, Gorky str., 39a.
Phone: 7 (924) 386-18-16.
Fax: 7 (3022) 32-30-58.
E-mail: miromanov_a@mail.ru

Образец цитирования:

А.М. Мироманов, Т.В. Забелло, Н.А. Мироманова
«Влияние полиморфизма генов *IL4-589C>T*, *FCGR2A-166His>Arg*, *DEFB1-20G>A*, *DEFB1-52G>A* на содержание $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-4$ и $IL-10$ у пациентов с первичным остеоартрозом тазобедренных суставов» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 1009-1016. doi: 10.15789/1563-0625-EOI-2034
© Мироманов А.М. и соавт., 2020

For citation:

A.M. Miromanov, T.V. Zabello, N.A. Miromanova “Effect of *IL4-589C>T*, *FCGR2A-166His>Arg*, *DEFB1-20G>A*, *DEFB1-52G>A* gene polymorphisms on $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-4$, and $IL-10$ contents in the patients with primary hip osteoarthritis”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 1009-1016. doi: 10.15789/1563-0625-EOI-2034
DOI: 10.15789/1563-0625-EOI-2034

-166His/His. У пациентов с генотипом -20A/A отмечен более высокий уровень TNF α и IL-1 β – в 1,2 и 1,3 раза, соответственно, по сравнению с генотипом -20G/G и в 1,3 раза по сравнению с генотипом -20G/A. Наличие генотипа -589T/T полиморфизма гена *IL4-589C>T* и генотипа -20A/A полиморфизма гена *DEFB1-20G>A* способствует высокому содержанию в сыворотке крови TNF α и IL-1 β , а носительство -166His/His полиморфизма гена *FCGR2A-166His>Arg* – как высокому уровню TNF α , IL-1 β , так и низкой концентрации IL-4, IL-10. Комплексное носительство генотипов – *FCGR2A166HisArg* x *DEFB152AA* x *DEFB120AA* x *IL4589TT* у больных с первичным коксартрозом увеличивает содержание цитокинов (TNF α , IL-1 β) в 1,5 и 1,7 раза соответственно.

Ключевые слова: полиморфизм, гены, цитокины, первичный остеоартроз, тазобедренные суставы

EFFECT OF *IL4-589C>T*, *FCGR2A-166His>Arg*, *DEFB1-20G>A*, *DEFB1-52G>A* GENE POLYMORPHISMS ON TNF α , IL-1 β , IL-4, AND IL-10 CONTENTS IN THE PATIENTS WITH PRIMARY HIP OSTEOARTHRISIS

Miromanov A.M., Zabello T.V., Miromanova N.A.

Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Abstract. Our objective was to study the effects of *IL4-589C>T*, *FCGR2A-166His>Arg*, *DEFB1-20G>A*, *DEFB1-52G>A* gene polymorphisms upon content of TNF α , IL-1 β , IL-4, and IL-10 in primary osteoarthritis of the hip joints. We performed a survey of 100 patients of Russian ethnicity (average age 61.3 \pm 8.5 years) with primary coxarthrosis at the stage III-IV who lived in the Trans-Baikal region. The control group (n = 100), were local residents, comparable by age (60 \pm 8.3 years), gender, habitation place and nationality. The exclusion criteria were as follows: close relationship; other types of osteoarthritis (post-traumatic, rheumatoid, metabolic, etc.); dysplastic syndromes and phenotypes; acute and chronic inflammatory diseases at the exacerbation stage; diabetes mellitus; osteoporosis; vascular diseases; obesity; malignant neoplasia; alcohol abuse. Along with clinical examination, the following laboratory methods were applied: immunological techniques, i.e., determination of TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-10; genetic testing using polymerase chain reaction, e.g., a point mutation of the *IL4* gene at the 589(C>T) position, *FCGR2A* at 166(His>Arg) site, *DEFB1* at the 20(G>A) and 52(G>A) positions. DNA from the peripheral blood of patients was used for the molecular genetic analysis. Radiographic examination was also carried out. The data were statistically processed using STATISTICA 6.1 software package (StatSoft, USA), Microsoft Office Excel 2019 for Windows 10. The differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$. Results. The -589T/T genotype of *IL4-589C>T* gene polymorphism indirectly contributes to higher content of TNF α and IL-1 β for primary osteoarthritis of the hip joints. The patients with -166Arg/Arg genotype have a 1.3-fold increase of certain cytokine concentrations, e.g., TNF α and IL-1 β , as compared with -166His/Arg genotype, and, conversely, lower content of IL-4 and IL-10 (1.3-fold) in comparison with -166His/His genotype. The patients with -20A/A genotype showed higher levels of TNF α and IL-1 β , respectively, 1.2 and 1.3 times, compared with -20G/G genotype, and 1.3 times *versus* the -20G/A genotype. Conclusions: 1. The presence of -589T/T genotype of the *IL4-589C>T* gene polymorphism and the -20A/A genotype of the *DEFB1-20G>A* gene polymorphism contributes to a high content of TNF α and IL-1 β in the blood serum, and the carriage of -166His/His *FCGR2A-166His>Arg* gene polymorphism is associated with both higher level of TNF α , IL-1 β , and a low concentration of IL-4, IL-10. 2. Complex carriers of *FCGR2A166HisArg* x *DEFB152AA* x *DEFB120AA* x *IL4589TT* genotypes in the patients with primary coxarthrosis increases the contents of TNF α , IL-1 β cytokines by 1.5 and 1.7 times, respectively.

Keywords: polymorphism, genes, cytokines, primary osteoarthritis, hip joints

Введение

Коксартроз (деформирующий остеоартроз тазобедренного сустава) – это хроническое дегене-

ративное, прогрессирующее и многофакторное заболевание тазобедренного сустава, характеризующееся наличием боли, хромотой, которое, в конечном итоге, приводит к невозможности вы-

полнять повседневную деятельность. Данное заболевание приводит к оперативному вмешательству (тотальному эндопротезированию сустава) в 80%, снижению работоспособности в 60%, инвалидности – 11,5%. Остеоартроз тазобедренных суставов значительно ухудшает качество жизни больного и приводит к большим социально-экономическим затратам [1, 5, 10]. Разработка методов доклинической диагностики для выявления начальных стадий коксартроза и своевременная профилактика может решить вышеуказанные проблемы. В современной медицине данная проблема широко освещается в научной печати и считается приоритетной [1, 5, 11].

Механизмы развития первичного остеоартроза активно изучаются, однако в этой теме до сих пор сохраняется множество белых пятен. Одним из важных и мало изученных звеньев патогенеза остеоартроза является генетически детерминированная реакция иммунной системы макроорганизма на различные воздействия; при дисбалансе которой возникают нарушения, приводящие в конечном итоге к патологическим изменениям костной и хрящевой ткани. Доказано, что синовиоциты (клетки синовиальной оболочки) выступают в качестве триггера воспалительного процесса в суставах-мишенях. Макрофагальные синовиоциты секретируют различные медиаторы воспаления и протеолитические ферменты, в частности цитокины (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-17, LIF), которые участвуют в инициации и прогрессировании остеоартрита. Такие цитокины, как ростовые факторы (FGF-2, TGF- β , CTGF, IGF-1, PDGF), также могут выступать в роли регуляторов регенерации костной и хрящевой тканей при воспалении в суставе. Изыскивая новые пути генетически-молекулярных взаимодействий, в результате которых биологически активные вещества в той или иной мере воздействуют на структуру сустава, будут способствовать не только пониманию этиопатогенетических механизмов остеоартрита, но и разработке новых способов доклинической диагностики данного заболевания и эффективных средств его лечения и профилактики [3, 9].

В настоящее время определены генетические факторы, которые играют важную роль в патогенезе различных остеоартрозов, например: пол (остеоартритом чаще страдают женщины); наследственная артроофтальмопатия (синдром Стиклера, при котором имеется мутация гена COL2A1, или гена COL11A2); различные наследственные патологические состояния и/или заболевания суставов и костей (гипермобильный синдром, различные дисплазии и др.); этниче-

ская принадлежность пациентов [2, 8, 15], однако изучение влияния генетических факторов в развитии вторичных остеоартрозов (диспластический, ревматоидный, подагрический) единичны и практически отсутствуют при идиопатическом коксартрозе [5, 12], что и явилось целью нашей работы.

Цель исследования – изучить влияние полиморфизма генов *IL4-589C>T*, *FCGR2A-166His>Arg*, *DEFB1-20G>A*, *DEFB1-52G>A* на содержание TNF α , IL-1 β , IL-4 и IL-10 при первичном остеоартрозе тазобедренных суставов.

Материалы и методы

Проведено обследование 100 пациентов русской национальности с первичным коксартрозом III-IV стадии (средний возраст 61,3 \pm 8,5 лет) проживающих в Забайкальском крае. Контрольная группа (n = 100) – резиденты сопоставимые по возрасту (60 \pm 8,3 лет), полу, месту проживания и национальности.

Критерии исключения: наличие родственных связей, другие виды остеоартрозов (посттравматические, ревматоидные, метаболические и пр.), диспластические синдромы и фенотипы, острые и хронические воспалительные заболевания в стадии обострения, сахарный диабет, остеопороз, сосудистые заболевания, ожирение, злокачественные новообразования, злоупотребление алкоголем.

При обследовании больных с первичным коксартрозом во внимание взяты основные клинические критерии: болевой синдром (механический, стартовый, блокадный) паховой области, тазобедренного сустава, области бедра; утренняя скованность < 30 мин; отечность мягких тканей; крепитация сустава; контрактура сустава; укорочение конечности [1]. В 90% случаев наблюдалось одновременное наличие данных критериев. Генетические исследования осуществляли путем определения мутации *IL4-589(C>T)*, *FCGR2A-166(His>Arg)*, *DEFB1-20(G>A)* и *DEFB1-52(G>A)* используя наборы праймеров «Литех»-«SNP» (Россия) [5]. Концентрацию TNF α , IL-1 β , IL-4 и IL-10 в сыворотке крови устанавливали с помощью тест-систем АО «Вектор-Бест» (Россия) методом иммуноферментного анализа.

Клинические, лабораторные и инструментальные (рентгенография) исследования осуществляли на стационарном этапе лечения.

Статистическая обработка данных была проведена при помощи пакета программ STATISTICA 6.1 (StatSoft, США), Microsoft Office Excel 2019 for Windows 10. С целью описания распределения

количественных признаков определялась медиана (Me) и процентиля ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для сравнения двух несвязанных групп использовали критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследуя встречаемость аллелей и генотипов генов *FCGR2A-166His>Arg*, *DEFB1-20G>A*, *DEFB1-52G>A*, *TLR2-753Arg>Gln*, *TLR6-249Ser>Pro*, *TNF α -308G>A*, *TGF β 1-25Arg>Pro*, *EGFR-2073A>T*, *IL4-589C>T* у больных с первичным остеоартрозом тазобедренных суставов, нами показано, что определение генотипов -166Arg/Arg гена *FCGR2A*, -52A/A гена *DEFB1*, -20A/A гена *DEFB1* и -589T/T гена *IL4* позволяет прогнозировать данное патологическое состояние, так как обнаружена связь носительства мутантных генотипов с возникновением коксартроза ($p = 10^{-10}$). Это свидетельствует о высоком риске развития первичного коксартроза [5]. Таким образом, в работе мы акцентировали внимание на изучении роли полиморфизма генов, которые вносят наибольший вклад в развитие данного заболевания.

Вторым этапом мы изучили концентрацию медиаторов воспаления – цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-10) у пациентов с первичным остеоартрозом тазобедренных суставов. Показано, что концентрация цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-4 и IL-10 среди пациентов с первичным коксартрозом значительно превышала значения контроля, подтверждая их роль в патогенезе деструкции хрящевой ткани суставов и субхондрального слоя кости [4, 13].

Изучая влияние генотипов исследуемых полиморфизмов генов на уровень TNF α , IL-1 β , IL-4 и IL-10, отмечено, что при первичном остеоартрозе тазобедренных суставов отмечено отсутствие влияния полиморфизма гена *DEFB1-52G>A* на концентрацию рассматриваемых цитокинов, тогда как при носительстве полиморфизма гена *IL4-589C>T*, гена *FCGR2A-166His>Arg*, гена *DEFB1-20G>A* выявлено значимое воздействие на их содержание в зависимости от носительства генотипа (табл. 1).

Наличие генотипа -589T/T полиморфизма гена *IL4-589C>T* опосредованно способствует наличию высокой концентрации TNF α и IL-1 β в плазме крови при первичном остеоартрозе тазобедренных суставов (табл. 1). Данный факт закономерен, поскольку показано, что при носительстве гомозиготного генотипа -589T/T гена *IL4* регистрируется сниженный синтез IL-4. Низкий уровень IL-4 приводит к преобладанию провос-

палительных цитокинов и длительному поддержанию процессов воспаления, что в конечном итоге способствует прогрессированию и хронизации деструктивных процессов в тканях макроорганизма [6].

Определяя значение SNP гена *FCGR2A-166His>Arg* в содержании изучаемых цитокинов у пациентов с коксартрозом, отмечено не только повышение их уровня по сопоставлению с контрольными цифрами, но и статистическая значимость различий в зависимости от носительства генотипа (табл. 1). У пациентов с генотипом -166Arg/Arg отмечалось повышение в 1,3 раза концентрации TNF α и IL-1 β по сопоставлению с -166His/Arg и, напротив, низкое содержание IL-4 и IL-10 относительно генотипа -166His/His. Таким образом, при первичном остеоартрозе тазобедренных суставов, наличие генотипа -166Arg/Arg полиморфизма гена *FCGR2A-166His>Arg* опосредованно способствует более высокой концентрации TNF α , IL-1 β и низкому содержанию интерлейкинов IL-4 и IL-10 (табл. 1), что не противоречит данным литературы, поскольку доказано, что CD32 (*FCGR2A*) является рецептором для иммуноглобулинов класса G. Данные рецепторы обнаружены на многих клетках (макрофагах, В-лимфоцитах и пр.) и играют важную роль во взаимодействии с иммуноглобулинами и в ответной реакции в виде активации данных клеток и синтеза ими различных БАВ, в том числе и цитокинов [5].

Изучая влияние полиморфизма гена *DEFB1-20G>A* на продукцию исследуемых белков (TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-10) у пациентов с идиопатическим остеоартрозом тазобедренных суставов зарегистрировано изменение их содержания в зависимости от генотипов рассматриваемого SNP (табл. 1). В группе с первичным коксартрозом, при -20A/A генотипе отмечен более высокий уровень TNF α и IL-1 β (в 1,2 и 1,3 раза соответственно) в сопоставлении с -20G/G и в 1,3 раза относительно -20G/A (табл. 1). Наличие генотипа -20A/A полиморфизма гена *DEFB1-20G>A* содействует в повышенной концентрации TNF α , IL-1 β при идиопатическом остеоартрозе тазобедренных суставов. Доказано, что полиморфные маркеры гена *DEFB1* связаны со сниженными (неполноценными) реакциями адаптивного иммунитета за счет дефектов в генах, что может приводить к компенсаторным механизмам его регуляции, и как следствие, увеличению концентрации других биологически активных молекул [7, 14].

Таким образом, при первичном коксартрозе наблюдается значимое увеличение провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β), уменьшение

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ TNF α , IL-1 β , IL-4 И IL-10 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА SNP, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), пг/мл

TABLE 1. CONTENT OF TNF α , IL-1 β , IL-4 AND IL-10 IN THE BLOOD SERUM DEPENDING ON THE SNP GENOTYPE, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), pg/ml

		Контроль Control			Первичный остеоартроз Primary osteoarthritis		
Генотип Genotype		<i>IL4-589C>T</i>					
		C/C (n = 73)	C/T (n = 25)	T/T (n = 2)	C/C (n = 29)	C/T (n = 37)	T/T (n = 34)
Цитокины Cytokines							
TNF α		0,44 (0,00-1,11)	0,47 (0,0-1,1)	0,73 (0,6-0,8)	6,78 (5,31-7,80) ¹	7,0 (5,42-7,80) ¹	7,88 (6,0-9,4) ^{1,2,3}
IL-1 β		0,4 (0,0-1,0)	0,46 (0,0-1,0)	0,44 (0,3-0,5)	6,04 (5,00-7,17) ¹	6,42 (5,20-7,24) ¹	7,25 (5,9-9,3) ^{1,2,3}
IL-4		0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	2,47 (1,47-2,90) ¹	2,49 (1,80-3,01) ¹	2,38 (1,85-2,91) ¹
IL-10		0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	2,32 (1,37-2,60) ¹	2,46 (2,00-2,79) ¹	2,3 (1,96-2,80) ¹
Генотип Genotype		<i>FCGR2A-166His>Arg</i>					
		His/His (n = 68)	His/Arg (n = 32)	Arg/Arg (n = 0)	His/His (n = 10)	His/Arg (n = 34)	Arg/Arg (n = 56)
Цитокины Cytokines							
TNF α		0,48 (0,00-1,05)	0,57 (0,17-1,10)	–	7,06 (5,90-7,92) ¹	6,04 (5,20-7,48) ¹	7,67 (6,4-8,5) ^{1,3}
IL-1 β		0,45 (0,0-1,0)	0,57 (0,1-1,1)	–	6,69 (5,50-7,11) ¹	5,93 (5,00-6,64) ¹	6,92 (5,9-8,5) ^{1,3}
IL-4		0 (0-0)	0 (0-0)	–	2,83 (2,80-3,64) ¹	2,44 (1,9-2,8) ^{1,2}	2,44 (1,8-2,9) ^{1,2}
IL-10		0 (0-0)	0 (0-0)	–	2,66 (2,6-3,1) ¹	2,41 (1,8-2,6) ^{1,2}	2,3 (2,0-2,9) ^{1,2}
Генотип Genotype		<i>DEFB1-20G>A</i>					
		G/G (n = 52)	G/A (n = 36)	A/A (n = 12)	G/G (n = 19)	G/A (n = 28)	A/A (n = 53)
Цитокины Cytokines							
TNF α		0,54 (0,00-1,08)	0,49 (0,00-1,12)	0,51 (0,00-0,94)	6,92 (5,50-7,61) ¹	6,7 (5,40-7,64) ¹	7,59 (6,05-8,10) ^{1,2,3}
IL-1 β		0,55 (0,00-1,05)	0,5 (0,00-1,03)	0,5 (0,0-1,0)	5,8 (5,00-6,78) ¹	6,08 (4,97-7,20) ¹	6,71 (5,90-7,92) ^{1,2,3}
IL-4		0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	2,6 (1,55-2,90) ¹	2,48 (1,8-2,8) ¹	2,44 (1,88-3,00) ¹
IL-10		0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	2,26 (1,30-2,76) ¹	2,24 (2,07-2,79) ¹	2,44 (1,98-2,78) ¹

Примечание. u,¹ – статистическая значимость различий с контролем при p ≤ 0,05; u,² – статистическая значимость различий с нормальной гомозиготой при p ≤ 0,05; u,³ – статистическая значимость различий с гетерозиготой при p ≤ 0,05.

Note. u,¹, statistical significance of differences with control at p ≤ 0.05; u,², statistical significance of differences with normal homozygous at p ≤ 0.05; u,³, statistical significance of differences with heterozygosity at p ≤ 0.05.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ С ПЕРВИЧНЫМ ОСТЕОАРТРОЗОМ ТАЗОБЕДРЕННЫХ СУСТАВОВ – НОСИТЕЛЕЙ МУТАНТНЫХ ГОМОЗИГОТ ГЕНОВ *FCGR2A-166His>Arg*, *DEFB1-52G>A*, *IL4-589C>T* И *DEFB1-20G>A*, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), пг/мл

TABLE 2. CONTENT OF CYTOKINES IN PATIENTS WITH PRIMARY OSTEOARTHRITIS OF THE HIP JOINTS – CARRIERS OF MUTANT HOMOZYGOTES OF THE GENES *FCGR2A-166His>Arg*, *DEFB1-52G>A*, *IL4-589C>T* AND *DEFB1-20G>A*, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), pg/ml

Группа Group	Цитокины Cytokines	TNF α	IL-1 β	IL-4	IL-10
Контроль Control (n = 100)		0,44 (0,00-1,11)	0,28 (0,0-1,0)	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)
Первичный остеоартроз Primary osteoarthritis (n = 89)		7,0 (5,8-7,8) ¹	6,42 (5,21-7,24) ¹	2,66 (1,90-2,99) ¹	2,5 (2,08-2,79) ¹
Первичный остеоартроз (4 мутантные гомозиготы) Primary osteoarthritis (4 mutant homozygotes) (n = 11)		10,78 (10,0-13,2) ^{1,2}	11,0 (9,95-13,10) ^{1,2}	1,87 (1,34-2,14) ¹	1,92 (1,29-2,29) ¹

Примечание. u,¹ – статистическая значимость различий с контролем при $p \leq 0,05$; u,² – статистическая значимость различий с группой без носительства 4 мутантных гомозигот при $p \leq 0,05$.

Note. u,¹, statistical significance of differences with control at $p \leq 0.05$; u,², statistical significance of differences with the group without carriage of 4 mutant homozygotes at $p \leq 0.05$.

противовоспалительных (IL-4, IL-10), что приводит к нарушению процессов гомеостаза в хрящевой и костной тканях [4, 13].

Учитывая полученные результаты, мы осуществили разделение пациентов в группе с коксартрозом на подгруппу с носительством четырех мутантных гомозигот генов *FCGR2A-166His>Arg*, *IL4-589C>T*, *DEFB1-52G>A* и *DEFB1-20G>A* и подгруппу без носительства сочетания четырех данных генотипов и определили их влияние на концентрацию исследуемых цитокинов (табл. 2).

Отмечено, что в подгруппе у пациентов с идиопатическим остеоартрозом – обладателей мутантных гомозигот генов *IL4-589C>T*, *FCGR2A-166His>Arg*, *DEFB1-52G>A* и *DEFB1-20G>A* – повышается концентрация провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β) в 1,7 и 1,8 раза, соответственно ($p = 0,0001$), по сопоставлению с подгруппой пациентов без носительства четырех мутантных гомозигот изучаемых полиморфизмов (табл. 2), что может свидетельствовать о «злокачественном» течении воспалительного процесса

в тазобедренных суставах. Персонифицированное рассмотрение носительства SNP в группе пациентов с первичным остеоартрозом тазобедренных суставов определило, что при наличии у них четырех мутантных гомозигот изучаемых SNP фиксируется развитие заболевания в более раннем возрасте (до 40 лет) и его быстрое прогрессирование. В то же время у пациентов группы контроля выявлено носительство только одной из исследуемых диких гомозигот [5].

Таким образом, определение генотипов и их воздействие на содержание биологически активных молекул содействует пониманию патогенетических механизмов развития первичного остеоартроза тазобедренных суставов, что может способствовать осуществлению персонифицированного прогноза и профилактики.

Выводы

1. Наличие генотипа -589Т/Т полиморфизма гена *IL4-589C>T* и генотипа -20А/А полиморфизма гена *DEFB1-20G>A* способствует вы-

сокому содержанию в сыворотке крови TNF α и IL-1 β , а носительство -166His/His полиморфизма гена *FCGR2A-166His>Arg* – как высокому уровню TNF α , IL-1 β , так и низкой концентрации IL-4, IL-10.

2. Комплексное носительство генотипов – *IL-4589TT* x *FCGR2A166HisArg* x *DEFB152AA* x *DEFB120AA* у больных с первичным коксартрозом увеличивает содержание цитокинов (TNF α , IL-1 β) в 1,5 и 1,7 раза соответственно.

Список литературы / References

1. Алексеева Л.И., Таскина Е.А., Кашеварова Н.Г. Остеоартрит: эпидемиология, классификация, факторы риска и прогрессирования, клиника, диагностика, лечение // Современная ревматология, 2019. № 2. С. 9-21. [Alekseeva L.I., Taskina E.A., Kashevarova N.G. Osteoarthritis: epidemiology, classification, risk and progression factors, clinic, diagnosis, treatment. *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology*, 2019, no. 2, pp. 9-21. (In Russ.)]
2. Алексенко Е.Ю. Фенотипический симптомокомплекс дисплазий соединительной ткани у больных первичным остеоартрозом [Электронный ресурс] // Забайкальский медицинский вестник, 2011. № 1. С. 57-61. Режим доступа: http://zabmedvestnik.ru/index.php?option=com_library&task (дата обращения: 20.03.2020). [Aleksenko E.Yu. Phenotypic symptom complex of connective tissue dysplasia in patients with primary osteoarthritis [Electron resource]. *Zabaykalskiy meditsinskiy vestnik = Transbaikalian Medical Bulletin*, 2011, no. 1, pp. 57-61. Access mode: http://zabmedvestnik.ru/index.php?option=com_library&task (Reference date: 20.03.2020).
3. Волков М.Ю. Роль Toll-подобных рецепторов и их эндогенных лигандов в патогенезе ревматоидного артрита // Научно-практическая ревматология, 2016. № 1. С. 78-85. [Volkov M.Yu. The role of Toll-like receptors and their endogenous ligands in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2016, no. 1, pp. 78-85. (In Russ.)]
4. Каратеев А.Е., Лиля А.М. Остеоартрит: современная клиническая концепция и некоторые перспективные терапевтические подходы // Научно-практическая ревматология, 2018. № 1 (56). С. 70-81. [Karateev A.E., Lila A.M. Osteoarthritis: current clinical concept and some promising therapeutic approaches. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2018, no. 1 (56), pp. 70-81. (In Russ.)]
5. Миromanов А.М., Забелло Т.В., Доржиев В.В., Миromanова Н.А., Емельянов А.С. Персонализированные аспекты развития идиопатического коксартроза // Гений ортопедии, 2017. № 3. С. 331-335. [Miromanov A.M., Zabello T.V., Dorzheev V.V., Miromanova N.A., Emelyanov A.S. Personalized aspects of idiopathic osteoarthritis of the hip joint. *Geniy ortopedii = Ilizarov Journal of Clinical and Experimental Orthopaedics*, 2017, no. 3(23), pp. 331-335. (In Russ.)]
6. Миromanов А.М., Миронова О.Б., Миromanова Н.А. Полиморфизм гена интерлейкина-4-589C>T и экспрессия интерлейкина-4 у пациентов с развитием хронического травматического остеомиелита // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 889-894. [Miromanov A.M., Mironova O.B., Miromanova N.A. Interleukin-4-589C>T gene polymorphism and expression of interleukin-4 in patients with the development of chronic traumatic osteomyelitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 889-894. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2018-6-889-894.
7. Свитич О.А., Ганковская Л.В., Рахманова И.В., Зайцева И.А., Ганковский В.А. Ассоциация полиморфных маркеров, локализованных в 5'-нетранслируемой области гена β -дефенсина DEFB1, с гипертрофией аденоидных вегетаций // Вестник РГМУ, 2012. № 3. С. 59-62. [Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Rakhmanova I.V., Zaitseva I.A., Gankovsky V.A. Association of polymorphic markers localized in the 5'-untranslated region of the β -defensin gene DEFB1 with hypertrophy of adenoid vegetation *Vestnik RGMU = Bulletin of the Russian State Medical University*, 2012, no. 3, pp. 59-62. (In Russ.)]
8. García-Ibarbia C., Neila S., Garcés C., Alonso M.A., Zarrabeitia M.T., Valero C., Ortiz F., Riancho J.A. Non-synonymous WNT16 polymorphisms alleles are associated with different osteoarthritis phenotypes. *Rheumatol. Int.*, 2017, Vol. 37, no. 10, pp. 1667-1672.
9. Grafe I., Alexander S., Peterson J.R., Snider T.N., Levi B., Lee B., Mishina Y. TGF- β family signaling in mesenchymal differentiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2018, Vol. 10, no. 5, pp. 1-66.
10. Hackinger S., Trajanoska K., Stykarsdottir U., Zengini E., Steinberg J. et al. Evaluation of shared genetic aetiology between osteoarthritis and bone mineral density identifies SMAD3 as a novel osteoarthritis risk locus. *Hum. Mol. Genet.*, 2017, Vol. 26, no. 19, pp. 3850-3858.
11. Karande S.P., Kini S., Karande S.P. Osteoarthritis: clinical and radiological correlation. *J. Assoc. Physicians India*, 2018, Vol. 66, no. 7, pp. 37-39.
12. Lespasio M.J., Sultan A.A., Piuze N.S., Khlopas A., Husni M.E., Muschler G.F., Mont M.A. Hip osteoarthritis: a primer. *Perm J.*, 2018, Vol. 22, pp. 17-84.

13. Mathiessen A., Conaghan P.G. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res. Ther.*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 1-9.

14. Semple C.A., Maxwell A., Gautier P., Kilanowski F.M., Eastwood H., Barran P.E., Dorin J.R. The complexity of selection at the major primate beta-defensin locus. *BMC Evol. Biol.* 2005, Vol. 5, no. 32, pp. 1-14.

15. Yi X., Xu E., Xiao Y., Cai X. Evaluation of the relationship between common variants in the TLR-9 gene and hip osteoarthritis susceptibility. *Genet. Test Mol. Biomarkers*, 2019, Vol. 23, no. 6, pp. 373-379.

Авторы:

Мироманов А.М. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой травматологии и ортопедии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

Забелло Т.В. — ассистент кафедры травматологии и ортопедии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

Мироманова Н.А. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой детских инфекций ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

Authors:

Miromanov A.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Traumatology and Orthopedics, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Zabello T.V., Assistant Professor, Department of Traumatology and Orthopedics, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Miromanova N.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pediatric Infections, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Поступила 23.04.2020
Принята к печати 17.05.2020

Received 23.04.2020
Accepted 17.05.2020

ПРИМЕНЕНИЕ CAST-ТЕСТА ДЛЯ ОЦЕНКИ У ЛЮДЕЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ К ВОЗБУДИТЕЛЮ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В.,
Логвиненко О.В., Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Буравцева Н.П.,
Тюменцева И.С., Курчева С.А., Куличенко А.Н.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Представлены результаты применения функционального цитометрического теста антиген-стимулированной активации базофилов для оценки специфической иммунологической реактивности у людей, больных сибирской язвой и иммунизированных сибиреязвенной вакциной. В качестве критерия наличия антигенспецифической активации базофилов измеряли экспрессию мембранного рецептора – CD63, отражающей процесс анафилактической дегрануляции базофильных гранулоцитов. Для определения спонтанной и антиген-индуцированной активации базофилов (CCR3⁺CD63⁺) применяли набор реагентов FlowCAST (Buhlmann laboratories AG, Швейцария). В качестве специфического антигена использовали экспериментальный сибиреязвенный аллерген – антраксин (гидролизат на основе штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1), производства ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора. На основании клинико-экспериментальных данных в качестве лабораторного критерия наличия у человека специфической IgE-опосредованной сенсибилизации к возбудителю сибирской язвы для иммунодиагностического CAST-теста *in vitro* принято значение – 10% и более активированных антраксином базофильных гранулоцитов (CCR3⁺CD63⁺). Показано, что у лиц, больных сибирской язвой в период до одной недели (3-7-й день) после заболевания, в 92,3% случаев получен положительный результат CAST, значения специфической активации антраксином базофилов в среднем составил 37,9% (12,01 ÷ 78,9%). При иммунологическом обследовании лиц через три недели после вакцинации против сибирской язвы была установлена CAST-позитивность у всех вакцинированных. Значения интенсивности антраксин-индуцированной активации базофилов у привитых находились в интервале от 10,87 ÷ 30,03%, составив в среднем 17,86%. Суммарное значение спонтанной и специфической активации детектировали в интервале 12,39 ÷ 41,46%. Проведенные исследования указывают на перспективу внедрения теста антигенной активации базофилов в формате Flow CAST для диагностики сибирской язвы и выявления специфической иммунной перестройки после вакцинации у людей, как показателя «фактической привитости». Использование CAST-теста с антраксином позволяет выявлять больных сибирской язвой на ранних сроках после начала заболевания (2-4-е сут.), в том числе среди пациентов с повышенным уровнем фоновых значений CCR3⁺CD63⁺, проводить оценку иммунологической эффективности вакцинации контингентов риска. Вместе с тем было установлено, что существенное снижение диагностической чувствительно-

Адрес для переписки:

Пономаренко Дмитрий Григорьевич
ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт»
Роспотребнадзора
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15.
Тел.: 8 (8652) 23-01-65 (доб. 119).
Факс: 8 (8652) 26-03-12.
E-mail: ponomarenko.dg@gmail.com

Address for correspondence:

Ponomarenko Dmitry G.
Stavropol Research Anti-Plague Institute
355035, Russian Federation, Stavropol,
Sovetskaya str., 13-15.
Phone: 7 (8652) 23-01-65 (add. 119).
Fax: 7 (8652) 26-03-12.
E-mail: ponomarenko.dg@gmail.com

Образец цитирования:

Д.Г. Пономаренко, Е.Л. Ракитина, М.В. Костюченко,
О.В. Логвиненко, А.Г. Рязанова, Л.Ю. Аксенова,
Н.П. Буравцева, И.С. Тюменцева, С.А. Курчева,
А.Н. Куличенко «Применение CAST-теста для оценки
у людей специфической реактивности к возбудителю
сибирской язвы» // Медицинская иммунология, 2020.
Т. 22, № 5. С. 1017-1024.

doi: 10.15789/1563-0625-UCT-2058

© Пономаренко Д.Г. и соавт., 2020

For citation:

D.G. Ponomarenko, E.L. Rakitina, M.V. Kostyuchenko,
O.V. Logvinenko, A.G. Ryazanova, L.Yu. Aksenova,
N.P. Buravtseva, I.S. Tyumentseva, S.A. Kurcheva,
A.N. Kulichenko "Using CAST-test to investigate human
specific hypersensitivity to the anthrax pathogen", 2020,
Vol. 22, no. 5, pp. 1017-1024.

doi: 10.15789/1563-0625-UCT-2058

DOI: 10.15789/1563-0625-UCT-2058

сти CAST-теста возможно у иммунных к возбудителю сибирской язвы пациентов, получавших интенсивную этиотропную антибактериальную и патогенетическую терапию на ранних стадиях инфекционного процесса, включающую глюкокортикостероиды и десенсибилизирующие средства, которые ингибируют в организме интенсивность процессов формирования гиперчувствительности (иммунологической реактивности) и ее выраженность.

Ключевые слова: сибирская язва, лабораторная диагностика, иммунодиагностика, антиген-стимулированная активация базофилов, сибирезвенный аллерген, сенсibilизация

USING CAST-TEST TO INVESTIGATE HUMAN SPECIFIC HYPERSENSITIVITY TO THE ANTHRAX PATHOGEN

Ponomarenko D.G., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Logvinenko O.V., Ryazanova A.G., Aksenova L.Yu., Buravtseva N.P., Tyumentseva I.S., Kurcheva S.A., Kulichenko A.N.

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. We present the results of applying functional cytometric test of antigen-stimulated activation basophils to assess specific immunological reactivity in the people with anthrax, and immunized with anthrax vaccine. As a criterion for antigen-specific basophil activation, we measured expression of the CD63 membrane receptor, which reflects the process of anaphylactic basophil degranulation. To determine spontaneous and antigen-induced activation of basophils (CCR3⁺CD63⁺), a FlowCAST reagent kit (Buhlmann laboratories AG, Switzerland) was used. Anthraxin, an experimental anthrax allergen (a hydrolysate the *Bacillus anthracis* STI-1 strain), manufactured by the Stavropol Anti-Plague Institute, was used as a specific antigen. As based on clinical and experimental data, a threshold value of > 10% of anthraxin-activated (CCR3⁺CD63⁺) basophils was accepted for the *in vitro* immunodiagnostic CAST test, as a laboratory criterion for the subjects exhibiting specific immune response, i.e., IgE-mediated sensitization. It was shown that, in anthrax patients within one week after onset of the disease (3-7 days), a positive CAST result was obtained in 92.3% cases; the levels of specific basophil activation with anthraxin averaged 37.9% (12.01 ÷ 78.9%). Immunological examination of individuals three weeks (21 days) after vaccination against anthrax revealed CAST-positivity in all the vaccinated persons. Intensity of anthraxin-induced basophil activation the vaccinated subjects was ranged from 10.87 to 30.03%, averaging 17.86%. The overall values of spontaneous and specific activation ranged within 12.39 ÷ 41.46%. The study opens prospectives for implementation of basophil antigenic activation test in the Flow CAST format in diagnostics of anthrax and to identify specific immune rearrangements after vaccination in humans, as an index of actual vaccination rates. Usage of CAST test with anthraxin makes it possible to identify anthrax patients at the early stages (2-4 days after onset of the disease) including, among patients with an increased CCR3⁺CD63⁺ background values, evaluation of immunological efficiency in the cohorts at risk for vaccination. At the same time, it was found that a significant decrease in diagnostic sensitivity of CAST test could be observed in the patients immune to anthrax pathogen who received intensive antibacterial and pathogenetic therapy at the early stages of infection, including glucocorticosteroids (anti-inflammatory drugs) and desensitizing agents that inhibit the degree of hypersensitivity development and its expression.

Keywords: anthrax, laboratory diagnostics, immunodiagnosics, antigen-stimulated activation of basophils, anthrax allergen, sensitization

Введение

В начальный период инфекционной болезни в организме преобладают иммунологические реакции гиперчувствительности немедленного типа, большая часть которых опосредована антителами класса E (реагинами) [12].

Ввиду низкой концентрации аллергенспецифических реагинов в острую фазу болезни и отсутствия коммерчески доступных диагностиче-

ских тест-систем для их выявления, оптимальной мишенью для исследования гиперчувствительности при инфекционном процессе могут быть базофилы. На мембране этих клеток отмечается сайт-опосредованная агрегация молекул иммуноглобулинов E. Повторное взаимодействие (*in vivo, ex vivo*) специфического аллергена с комплементарными реагинами приводит к формированию иммунореактивного ответа — реакции ги-

перчувствительности немедленного типа (I тип, IgE-зависимый) [9, 24].

Кооперация аллергена с IgE и последующее перекрестное рецептор-специфическое (high-affinity Fc RI) «сшивание» с мембраной базофилов сопровождается продукцией (секрецией) клеткой веществ-медиаторов воспаления. В настоящее время выявлен целый ряд различных маркеров (рецепторов), которые могут быть использованы для цитометрической идентификации базофилов (CCR3, CD123, FcεRI, CRTN2 и др.) и количественного анализа их активации (оценка экспрессии антигенов CD203c, CD63, CD294, CD107a, CD107b, CD13, CD164 и др.). У различных рецепторов активации неодинаковые интенсивность спонтанной/индуцированной экспрессии и локализация в клетке [13, 16, 17, 18, 22, 23, 25, 26, 27, 28].

К наиболее информативным и широко изученным показателям, определяющим активацию базофилов, относят рецепторы CD63, CD203c, диагностическая значимость которых эквивалентна [14, 15, 20]. Вместе с тем CD63 относится к мембранным белкам, которые непосредственно ассоциированы с компонентами мультивезикул лизосом внутренней мембраны базофилов. Индуцированная трансмембранная (экстрацеллюлярная) экспрессия рецептора CD63 теснейшим образом связана с дегрануляцией (активацией) базофилов [19].

К настоящему времени тест активации базофилов с использованием проточной цитометрии (Cellular Antigen Stimulation Test – CAST) практически полностью заменил традиционные методы исследования дегрануляции базофилов с использованием анализа высвобождения гистамина, лейкотриенов и других медиаторов иммунореактивных процессов [21].

ФКУЗ Ставропольским противочумным институтом Роспотребнадзора разработаны методические подходы для иммунодиагностики бруцеллеза и сибирской язвы, основанные на CAST-тесте [5, 7, 8].

Предложенный подход для лабораторной диагностики сибирской язвы применяется в работе Референс-центра по мониторингу за возбудителем сибирской язвы при исследовании материала от людей, подозрительных на заболевание сибирской язвой. Тест применялся при исследовании масштабной вспышки сибиреязвенной инфекции в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г. [4].

Интеграция в практику иммунологического теста CAST с сибиреязвенным аллергеном, позволит усовершенствовать существующий алгоритм лабораторной диагностики сибирской язвы и предложить эффективный способ оценки фактической привитости контингента после вакцинации против сибирской язвы.

Цель исследований – анализ применения CAST-теста для оценки специфической реактивности у людей, больных сибирской язвой и привитых сибиреязвенной вакциной.

Материалы и методы

Всего в исследовании участвовали 80 человек: 50 – больных сибирской язвой, 10 – привитых сибиреязвенной вакциной (производства ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны России, г. Киров), обследованных на 21-й день после иммунизации. Контрольную группу (лица неиммунные к *Bacillus anthracis*) составили 20 здоровых добровольцев.

Все обследуемые предоставили в установленном порядке [11] согласие на участие в исследованиях.

Для постановки CAST-теста использовали тест-систему Flow CAST (Buhlmann laboratories AG, Швейцария). Измерение интенсивности спонтанной и индуцированной аллергеном экспрессии CD63 на мембране базофилов проводили в цельной крови, стабилизированной этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) без предварительного выделения популяции лейкоцитов.

Выделение зоны интересов проводили в координатах прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния (BD Cell Quest™), селекцию базофилов выполняли по CCR3_{pos}/SSC_{low}, учитывали не менее 500 клеток. Детекцию базофилов осуществляли с помощью МКАТ анти-CCR3-PE, маркеров дегрануляции – анти-CD63-FITC. Процедура постановки теста активации базофилов соответствовала протоколу «BAT FlowCAST». Цитометрический анализ проводили с использованием цитофлуориметра FACS Calibur (BD, США).

По результатам ранее проведенных нами исследований [5] был определен в соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008 [2] порог клинического решения для данного иммунотеста – числовое значение, принятое на основании экспериментов в качестве лабораторного критерия наличия (или отсутствия) специфической иммунной реактивности к возбудителю сибирской язвы. Было установлено, что количество CD63⁺базофилов, активированных сибиреязвенным аллергеном от 0 до 10% – отрицательный результат CAST-теста, более 10% – положительный. Положительный результат CAST-теста (CCR3⁺CD63⁺ > 10%) свидетельствует о наличии в организме специфической сенсibilизации к антигенам сибиреязвенного микроба, которая возникает при инфекционном процессе или формировании поствакцинального иммунитета.

При математической обработке результатов рассчитывали среднее арифметическое (x_{cp}), интервал значений ($\min \div \max$) и доли в процентном отношении [10].

В качестве аллергена использовали антраксин — гидролизат на основе штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1 (экспериментальные серии препарата производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора).

Диагностические исследования на сибирскую язву проводили согласно методическим указаниям МУК 4.2.2413-08 [6]. Оценку наличия специфических антител к возбудителю сибирской язвы в сыворотках крови осуществляли методом нМФА с использованием экспериментальной тест-системы (производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора). Для постановки ПЦР применяли набор реагентов «АмплиСенс® *Bacillus anthracis*-FRT» производства ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Россия).

Работа с биоматериалом проводилась в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53079.4-2008 [3], СП 1.3.31.18-13 [9].

Результаты

При разработке подхода к иммунодиагностике сибирской язвы, основанного на тесте активации базофилов *in vitro*, опытным путем было определено количество аллергена — антраксина, необходимое для исключительно специфической стимуляции клеток. С учетом ранее проведенных опытов [5], стабильно воспроизводимый резуль-

тат у лиц неиммунных к возбудителю сибирской язвы (контрольная группа), а также больных сибирской язвой и привитых вакциной против сибирской язвы, получен при использовании антраксина в дозе 20 мкг белка в 50 мкл препарата.

Значения интенсивности антраксин-индуцированной активации базофилов — $CCR3^+CD63^+$ (%) у лиц из контрольной группы находились в интервале $0,36 \div 9,83\%$ ($x_{cp} - 5,86\%$).

При иммунологическом обследовании больных кожной формой сибирской язвы (13 пациентов, на 3-7-й день заболевания) положительный результат был получен в 92,3% случаев (у 12 человек). Уровень специфической активации антраксином базофилов в среднем составил 37,9% ($12,01 \div 78,9\%$), фоновые значения интенсивности экспрессии маркера дегрануляции находились в интервале — $0 \div 21,0\%$.

У четырех больных сибирской язвой выявлены повышенные (более 10%) фоновые значения экспрессии базофилами CD63 ($CCR3^+CD63^+$) — 12,02, 14,7, 20,4 и 21,0%. При этом, вне зависимости от достаточно высоких фоновых значений $CCR3^+CD63^+$, после стимуляции антраксином уровень активации базофилов имел статистически значимую разницу значений показателей — 66,0; 49,2; 32,5 и 40,0%, превышающую исходные в 1,6-5,4 раза (рис. 1).

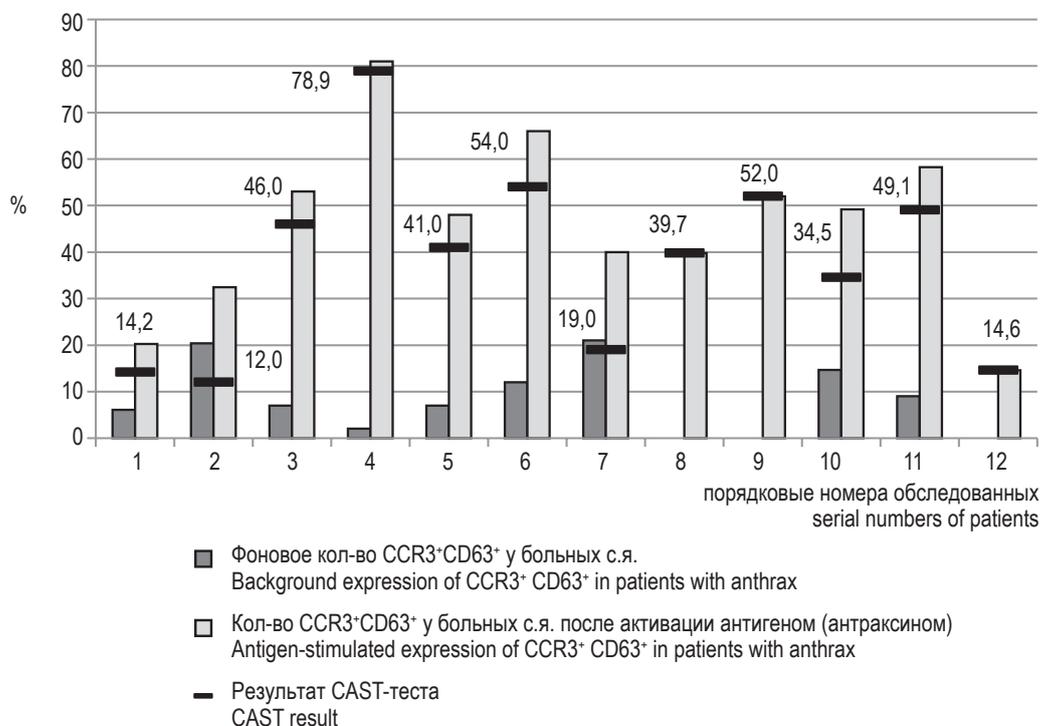


Рисунок 1. Значения фоновой и антиген-стимулированной экспрессии базофилами рецептора CD63 у больных сибирской язвой на 3-7-й день после заболевания

Figure 1. Background and antigen-stimulated expression of CD63 receptor basophils in patients with anthrax on days 3-7 after disease

При анализе результатов бактериологических, молекулярно-генетических (ПЦР) и серологических (нМФА) исследований клинического материала от CAST-положительных больных сибирской язвой ($n = 12$), установлено, что среди обследованных у двух больных выделена культура сибиреязвенного микроба (16,7%), у девяти выявлена ДНК *B. anthracis* (75,0%), восьми (66,7%) больных обнаружены антитела к возбудителю сибирской язвы в титрах от 1:40 до 1:320.

У одного обследованного с отрицательными CAST-реакциями выявлены специфические противосибиреязвенные антитела в диагностическом титре – 1:40.

Анализ результатов исследования материала от 34 заболевших сибирской язвой в процессе вспышки в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г., отобранного для иммунологического исследования (нМФА, CAST) через 2-3 недели от начала заболевания, показал, что только у 7 (20,6%) заболевших результаты иммунологических тестов положительные: у 3 (8,8%) в сыворотке крови выявлены специфические антитела и у 6 (17,6%) отмечались положительные результаты CAST-теста. Уровень специфической активации базофилов у CAST-положительных был в среднем 18,8% ($11,1 \div 38,5\%$). Среди CAST-положительных больных, у двух (33,3%) выявлены специфические противосибиреязвенные антитела в титрах 1:40, пяти – ранее (на 4-7 день заболевания) была установлена положительная ПЦР (83,3%) (рис. 2).

У обследованных больных сибирской язвой с отрицательными результатами CAST-теста (28 чел.) уровень антиген-индуцированной экспрессии базофилами маркера CD63 составил в среднем 3,96% ($0,26 \div 9,37\%$).

Отрицательные результаты CAST-тестирования у заболевших сибирской язвой в очаге инфекции в ЯНАО связаны с тем, что больные уже на ранних сроках заболевания получали интенсивную этиотропную антибактериальную и патогенетическую терапию, включающую глюкокортикостероиды, которые ингибируют в организме интенсивность процессов формирования гиперчувствительности (иммунологической реактивности) и ее выраженность.

При иммунологическом обследовании лиц через три недели после вакцинации против сибирской язвы была установлена CAST-положительность у всех вакцинированных. Значения интенсивности антраксин-индуцированной активации базофилов у привитых находились в интервале от 10,87 \div 30,03% ($x_{cp} = 17,86\%$). Суммарное значение спонтанной и специфической активации детектировали в интервале 12,39 \div 41,46% (рис. 3).

Анализ результатов исследования показал, что при обследовании неиммунных к возбудителю сибирской язвы добровольцев с использованием

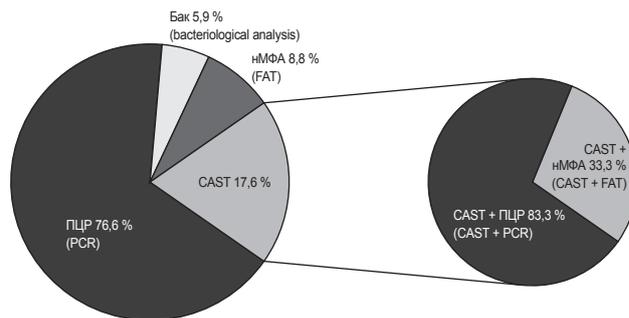


Рисунок 2. Доля положительных результатов лабораторного обследования у больных сибирской язвой, в том числе среди CAST-положительных больных

Figure 2. Proportion of positive laboratory examination results in patients with anthrax, including among CAST-positive patients

теста антигенной активации базофилов и технологии проточной цитометрии, у всех получены отрицательные результаты CAST-теста, что может указывать на достаточно высокую диагностическую специфичность (информативность) метода.

На основании клинко-экспериментальных данных в качестве лабораторного критерия наличия у человека специфической IgE-опосредованной сенсibilизации к возбудителю сибирской язвы (порог клинического решения по ГОСТ Р 53022.3-2008 [2]), для предложенного иммунодиагностического теста *in vitro*, принято значение – 10% и более активированных антраксином базофилов ($CCR3^+CD63^+$). Возможно, в перспективе, при обследовании лиц иммунных и неиммунных к *B. anthracis*, в целях более точной интерпретации CAST-теста могут быть выделены несколько порогов принятия клинического решения, например – «слабоположительный», «положительный» и «резко положительный».

Таким образом, при обследовании лиц, больных сибирской язвой на 3-7-й день после заболевания, в 92,3% случаев получен положительный результат тестирования методом CAST в цитометрическом формате.

В результате исследований клинического материала от больных сибирской язвой из очага инфекции в ЯНАО в 2016 г. положительный ответ теста антигенной активации базофилов получены только в 17,6% случаев. Низкий уровень CAST-положительности, очевидно, связан с тем, что материал для исследования был взят через 2-3 недели после заболевания, у пациентов, получавших с первых дней болезни интенсивное лечение, включающее глюкокортикостероиды, ингибирующие реакции гиперчувствительности. Этот факт должен учитываться при оценке результатов иммунологических методов лабораторной диагностики сибирской язвы.

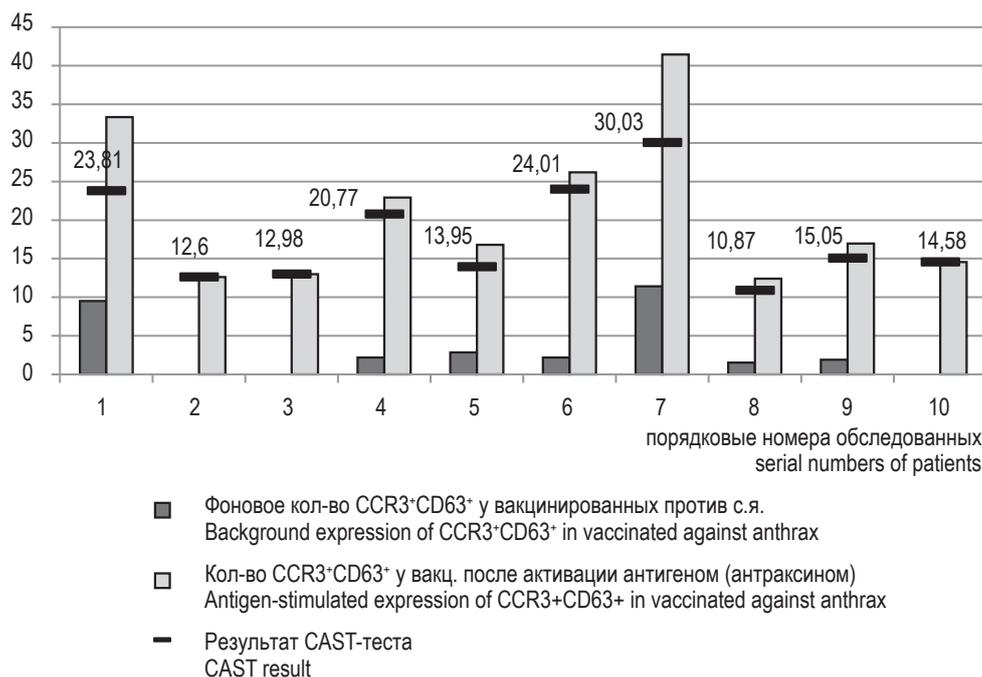


Рисунок 3. Значения фоновой и стимулированной антигеном экспрессии базофилами маркера CD63 у вакцинированных против сибирской язвы

Figure 3. Background and antigen-stimulated expression of CD63 receptor basophils in vaccinated against anthrax

Проведенные исследования указывают на перспективу внедрения теста антигенной активации базофилов в формате Flow CAST для диагностики сибирской язвы и выявления специфической иммунной перестройки после вакцинации у людей, как показателя «фактической привитости». Использование CAST-теста с антраксином позволяет выявлять больных сибирской язвой на ранних сроках после на-

чала заболевания (2-4-е сут.), в том числе среди пациентов с повышенным уровнем фоновых значений CCR3⁺CD63⁺, проводить оценку иммунологической эффективности вакцинации контингентов риска. Исследования так же показали, что существенное снижение диагностической чувствительности CAST-теста возможно у пациентов, получавших гормональную терапию.

Список литературы / References

1. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности): санитарно-эпидемиологические правила. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. 195 с. [Safety of work with microorganisms of I-II pathogenicity (danger) groups: sanitary and epidemiological rules]. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2014. 195 p.
2. ГОСТ Р 53022.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. [GOST R 53022.3-2008 Clinical laboratory technologies. Requirements for quality of clinical laboratory tests. Part 3. Assessment of laboratory tests clinical significance].
3. ГОСТ Р 53079.4-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа [GOST R 53079.4-2008 Clinical laboratory technologies. Quality assurance of clinical laboratory tests. Part 4. Rules for conducting of preanalytical stage].
4. Демина Ю.В., Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Кузнецова И.В., Котенев Е.С., Головинская Т.М., Буравцева Н.П., Еременко Е.И., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Цыганкова О.И., Котенева Е.А., Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Бахтеева И.В., Картавая С.А., Нечепуренко Л.А., Харьков В.В., Косарева Л.Э., Эрдни-Горяева Г.В., Ашенов А.М., Леонтьева С.А., Таджидинов В.О. Организация лабораторных исследований клинического материала и проб из объектов окружающей среды во время вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г. // Проблемы особо опасных инфекций, 2017. № 1. С. 44-48. [Demina Yu.V., Riazanova A.G., Aksenova L.Yu., Kuznetsova I.V., Kotenev E.S., Golovinskaya T.M., Buravtseva N.P., Eremenko E.I., Ponomarenko D.G., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Tsygankova O.I., Koteneva E.A., Dyatlov I.A.,

Timofeev V.S., Bakhteeva I.V., Kartavaya S.A., Nechepurenko L.A., Kharkiv V.V., Kosareva L.E., Erdni-Goryaeva G.V., ashenov a.m., Leontieva S. A., tadjidinov V. O. Organization of laboratory research of clinical Material And samples From Environmental Objects during the outbreak of anthrax In the Yamalo-Nenets Autonomous district in 2016 . *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2017, no. 1, pp. 44-48. (In Russ.)]

5. Куличенко А.Н., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Рязанова А.Г. Использование теста активации базофилов с антраксином для лабораторной (*in vitro*) диагностики сибирской язвы // Проблемы особо опасных инфекций, 2012. № 3 (113). С. 86-88. [Kulichenko A.N., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Logvinenko O.V., Ryazanova A.G. Use of the basophil activation test with anthraxin for laboratory (*in vitro*) diagnostics of anthrax. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2012, no. 3 (113), pp. 86-88. (In Russ.)]

6. Методические МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200075231>. [Methodical MUK 4.2.2413-08 "Laboratory diagnostics and detection of anthrax causative agent" [Electronic resource]. Access mode: <http://docs.cntd.ru/document/1200075231>.

7. Пономаренко Д.Г. Новый подход к комплексной оценке иммуно-биологической реактивности контингента, подлежащего вакцинации (ревакцинации) против бруцеллеза // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы, 2015. № 3. С. 28-31. [Ponomarenko D.G. a New approach to the comprehensive assessment of immunobiological reactivity of the population subject to vaccination (revaccination) against brucellosis. *Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni. Aktualnye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Issues*, 2015, no. 3, pp. 28-31. (In Russ.)]

8. Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Саркисян Н.С., Ракитина Е.Л., Голубь О.Г., Куличенко А.Н. Новый подход к аллергодиагностике бруцеллеза // Инфекция и иммунитет, 2013. Т. 3, № 1. С. 89-92. [Ponomarenko D.G., Logvinenko O.V., Sarkisyan N.S., Rakitina E.L., Golub O.G., Kulichenko A.N. a New approach to the allergodiagnosis of brucellosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, Vol. 3, no. 1, pp. 89-92. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2013-89-92.

9. Романова И.В. Гончаров А.Е. Тест активации базофилов: технология метода и его применение в клинической практике // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2018. № 1. С. 26-34. [Romanova I.V. Goncharov A.E. Basophil activation Test: method technology and its application in clinical practice. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2018, no. 1, pp. 26-34. (In Russ.)]

10. Урбах В.Ю. Биометрические методы. М.: Наука, 1964. 410 с. [Urbach V.Yu. Biometric methods]. Moscow: Nauka, 1964. 410 p.

11. Федеральный закон от 21.11.2011 N 323-ФЗ (ред. от 01.04.2020) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». [Federal Law of November 21, 2011 N 323-ФЗ (as amended on April 1, 2020) "On the Basics of Protecting the Health of Citizens in the Russian Federation"].

12. Шейх М.М. Роль инфекционной аллергии при пневмониях у детей // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2002. № 2. С. 106-110. [Sheikh M.M. The role of infectious allergy in children with pneumonia. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2002, no. 2, pp. 106-110. (In Russ.)]

13. Arai T., Sakurai D., Iinuma T., Nakagawa T., Yonekura S., Okamoto Y. Basophils from allergic rhinitis patients show allergen-specific upregulation of thymic stromal lymphopoietin receptor. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2018, Vol. 120, no. 2, pp. 155-163.

14. Boumiza R., Debard A.L., Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin. Mol. Allergy*, 2005, Vol. 3, 9. doi:10.1186/1476-7961-3-9.

15. Chirumbolo S., Vella A., Ortolani R., De Gironcoli, M., Solero, P., Tridente, G., Bellavite, P. Differential response of human basophil activation markers: a multi-parameter flow cytometry approach. *Clin. Mol. Allergy*, 2008, no. 6, pp. 12-16.

16. Ducrest S., Meier F., Tschopp C., Pavlovic R., Dahinden C.A. Flowcytometric analysis of basophil counts in human blood and inaccuracy of hematology analyzers. *Allergy*, 2005, Vol. 60, no. 11, pp. 1446-1450.

17. Eberlein B., Hann R., Eyerich S., Pennino D., Ring J., Schmidt-Weber C.B., Buters J. Optimizing of the basophil activation test: comparison of different basophil identification markers. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2015, Vol. 88, no. 3, pp. 183-189.

18. Hausmann O.V., Gentinetta T., Fux M., Ducrest S., Pichler W.J., Dahinden C.A. Robust expression of CCR3 as a single basophil selection marker in flow cytometry. *Allergy*, 2011, Vol. 66, no. 1, pp. 85-91.

19. Hemmings O., Kwok M., McKendry R., Santos A.F. Basophil activation test: old and new applications in allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2018; Vol. 18, no. 12, 77. doi:10.1007/s11882-018-0831-5.

20. Mikkelsen S., Bibby B.M., Dolberg M.K., Dahl R., Hoffmann H.J. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. *Clin. Mol. Allergy*, 2010, Vol. 8, no. 1, 2. doi:10.1186/1476-7961-8-2.

21. Mommert S., Kleiner S., Gehring M., Eiz-Vesper B., Stark H., Gutzmer R., Werfel T., Raap U. Human basophil chemotaxis and activation are regulated via the histamine H4 receptor. *Allergy*, 2016, Vol. 71, no. 9, pp. 1264-1273.

22. Monneret G. Is this time for CRT2/DP2 in a flow cytometric basophil activation test? *Clin. Exp. Allergy*, 2008, Vol. 38, no. 7, pp. 1239-1240.

23. Monneret G. CCR3 for basophil activation test: a necessary but insufficient step. *Clin. Exp. Allergy*, 2010, Vol. 40, no. 6, 953. doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03516.x.
24. Prussin C., Metcalfe D.D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 117, no. 2, pp. 450-456.
25. Sabato V., Boita M., Shubber S., Bridts C.H., Shibuya A., de Clerck L.S., Falcone F.H., Ebo D.G. Mechanism of phosphatidylserine inhibition of IgE/FcεRI-dependent anaphylactic human basophil degranulation via CD300a. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 3, pp. 734-737.
26. Santos A.F., Shreffler W.G. Road map for the clinical application of the basophil activation test in food allergy. *Clin. Exp. Allergy*, 2017, Vol. 47, no. 9, pp. 1115-1124.
27. Witting Christensen S.K., Kortekaas Krohn I., Thuraiayah J., Skjold T., Schmid J.M., Hoffmann H.J. Sequential allergen desensitization of basophils is non-specific and may involve p38 MAPK. *Allergy*, 2014, Vol. 69, no. 10, pp. 1343-1349.
28. Zaidi A.K., Saini S.S., Macglashan D.W. Jr. Regulation of Syk kinase and FcRβ expression in human basophils during treatment with omalizumab. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 125, no. 4, pp. 902-908.

Авторы:

Пономаренко Д.Г. — к.б.н., заведующий лабораторией бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Ракитина Е.Л. — к.м.н., врач КЛД сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Костюченко М.В. — биолог сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Логвиненко О.В. — к.б.н., заведующий сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Рязанова А.Г. — к.м.н., заведующая лабораторией сибирской язвы ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Аксенова Л.Ю. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории сибирской язвы ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Буравцева Н.П. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории сибирской язвы ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Тюменцева И.С. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Курчева С.А. — к.б.н., заведующая научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Куличенко А.Н. — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Authors:

Ponomarenko D.G., PhD (Biology), Head, Brucellosis Laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Rakitina E.L., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Sector of Immunology and Pathomorphology of Especially Dangerous Infectious Diseases, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Kostyuchenko M.V., Biologist, Sector of Immunology and Pathomorphology of Especially Dangerous Infectious Diseases, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Logvinenko O.V., PhD (Biology), Head, Sector of Immunology and Pathomorphology of Especially Dangerous Infectious Diseases, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Ryazanova A.G., PhD (Medicine), Head, Anthrax Laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Aksenova L.Yu., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Anthrax Laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Buravtseva N.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Anthrax Laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Tyumentseva I. S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory for Research and Production of Preparations for Diagnostics of Especially Dangerous and other Infections, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Kurcheva S.A., PhD (Biology), Head, Laboratory for Research and Production of Preparations for Diagnostics of Especially Dangerous and other Infections, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Kulichenko A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Поступила 22.05.2020
Принята к печати 26.05.2020

Received 22.05.2020
Accepted 26.05.2020

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, кДа 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

Абрамова Т.Я.....	847	Илюхин П.А.	943	Наговицына Е.Б.....	915	Старовойтова Е.М.	957
Аксенова Л.Ю.	1017	Калиновская Н.Ю.	933	Недоспасов С.А.....	827	Сулутьян А.Э.	847
Арсентьева Н.А.	993	Каспаров Э.В.....	907	Нероев В.В.....	943	Супрун Е.Н.....	915
Балацкая Н.В.....	943	Ким А.Я.....	957	Нечаев А.И.	977	Супрун С.В.	915
Балясников В.Е.....	837	Козлов В.А.....	837	Новикова А.Ю.....	943	Терещенко С.Ю.....	907
Баранова О.П.	993	Козлов В.А.....	847	Новикова И.А.....	987	Тимганова В.П.....	977
Барило А.А.....	925	Колерова А.В.....	837	Овчаренко Е.С.....	897	Тотоян Арег А.	993
Бейкин Я.Б.....	969	Коноплева О.С.....	907	Пичугова С.В.....	969	Тюменцева И.С.....	1017
Бердюгина О.В.....	867	Костюченко М.В.....	1017	Полозова Э.И.....	1003	Ужвиюк С.В.....	977
Блинова Е.А.....	837, 847	Кудерова Н.И.....	915	Пономаренко Д.Г.....	1017	Федоткина Т.В.....	957
Бозрова С.В.....	827	Кудрявцев И.В.....	887, 993	Пузанова Е.В.....	1003	Филатова Е.Ю.....	933
Борисов А.Г.....	887	Куличенко А.Н.....	1017	Раев М.Б.....	977	Храмцов П.В.....	977
Бочкова М.С.....	977	Курчева С.А.....	1017	Ракитина Е.Л.....	1017	Цуканов В.В.....	897
Буравцева Н.П.....	1017	Лазарева Н.М.....	993	Рыбина И.В.....	969	Чумасова О.А.....	847
Гвоздев И.И.....	887	Лапин С.В.....	957	Рябина М.В.....	943	Чурилов Л.П.....	957
Гвоздецкий А.Н.....	957	Лебедько О.А.....	915	Рязанова А.Г.....	1017	Шардина К.Ю.....	977
Гришина Л.В.....	847	Логвиненко О.В.....	1017	Савченко А.А.....	887	Шахтшнейдер Е.В.....	907
Друцкая М.С.....	827	Любимова Н.Е.....	993	Сеськина А.А.....	1003	Шенфельд И.....	957
Елманова Н.Г.....	897	Малинчик М.А.....	907, 925	Сесь Т.П.....	993	Ширинский В.С.....	933
Железко В.В.....	987	Мироманов А.М.....	1009	Сизиков А.Э.....	847	Ширинский И.В.....	933
Забелло Т.В.....	1009	Мироманова Н.А.....	1009	Синяков А.А.....	897	Шолан Р.Ф.....	879
Заморова С.А.....	977	Михайлова Л.Р.....	957	Смирнова О.В.....	897	Яблонский П.К.....	957
Золотых В.Г.....	957	Москаленко О.Л.....	897	Смирнова С.В.....	907, 925		
Илькович М.М.....	993	Мошев А.В.....	887	Смоляникова М.В.....	907, 925		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адьювант.....	958	люминол-зависимая		саркоидоз.....	993
активность ферментов.....	888	хемилюминесценция.....	978	сенсibilизация.....	1018
активные формы кислорода.....	978	маммопластика.....	958	сердечно-сосудистые события.....	1003
акупунктура.....	933	маркеры активации.....	848	сибирезвенный аллерген.....	1018
антиген-стимулированная активация		маркеры пролиферации.....	848	сибирская язва.....	1018
базофилов.....	1018	метаболизм.....	888	сигнальные молекулы.....	916
антигены.....	888	метаболический синдром.....	933, 1003	силикон.....	958
антиоксидантная защита.....	898	метаболический синдром.....	933, 1003	синдром болезненного	
антиспермальные антитела.....	969	модель воспаления <i>in vitro</i>	837	мочевого пузыря.....	879
апоптоз.....	848	моноциты.....	868, 898	синдром Гиппеля—Линдау.....	944
артериальная гипертензия.....	1003	моча.....	879	системная красная волчанка.....	987
аутоантитела.....	958	неавтономные эффекты апоптоза.....	848	степень тяжести заболевания.....	908
аутоиммунитет.....	958	нейтрофилы.....	868, 888, 898	тазобедренные суставы.....	1010
аутоиммунно-воспалительный		нейтрофильные внеклеточные		туберкулема.....	868
синдром.....	958	ловушки.....	987	тучные клетки.....	879
бесплодие.....	969	неспецифическое воспаление.....	1003	факторный анализ.....	868
биоптат.....	879	оксид графена.....	978	фактор роста нервов.....	879
бронхиальная астма.....	908, 916	остеоартрит.....	933	фенотип.....	888
варикоцеле.....	969	пандемия.....	827	хемилюминесценция.....	898
варикоцелеэктомия.....	969	патогенез.....	944, 1003	хемокины.....	993
воспаление.....	879, 933	первичный остеоартроз.....	1010	хронический атрофический гастрит.....	898
ген <i>VHL</i>	944	перекисное окисление липидов.....	898	центральные Т-клетки памяти.....	837
гены.....	1010	периферическая кровь.....	868	цитокинный дисбаланс.....	1003
гипоксия.....	1003	плазма крови.....	993	цитокины.....	879, 908, 925, 933, 944, 1010
дети.....	916	подростки.....	969	«Эпигенорм антивир».....	933
иммунный статус.....	916	полиморфизм.....	908, 1010	эффeкторные Т-клетки памяти.....	837
иммунодиагностика.....	1018	полиморфизм генов.....	925	CD11b.....	868
индуцированный адьювантами		полиэтиленгликоль.....	978	CD11c.....	868
(АСИА).....	958	провоспалительные цитокины.....	837	CD5.....	837
интерстициальный цистит.....	879	пролактин.....	958	IL-7.....	837
капиллярная гемангиома сетчатки.....	944	противовирусная терапия.....	827	IL-13.....	908
кластерный анализ.....	868	протоочная цитометрия.....	868	IL23.....	925
«клеточное соседство».....	848	псориаз.....	925	IL31.....	925
контроль заболевания.....	908	псориатический артрит.....	925	IL33.....	925
коронавирус.....	827	рак желудка.....	898	NK-клетки.....	868
корреляция.....	898	рак почки.....	888	SARS-CoV-2.....	827
лабораторная диагностика.....	1018	ревматоидный артрит.....	848	Toll-подобные рецепторы.....	916
лейкоциты.....	978	рецептор для IL-7.....	837		
		ростовые факторы.....	993		

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

ISSN 1563-0625



9 771563 062002 >