

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ноябрь-декабрь

2021, том 23

№ 6

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

Кашкин Кирилл Павлович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

Козлов Владимир Александрович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Корнева Елена Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Мазуров Вадим Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, президент Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова Минздрава России, заведующий кафедрой терапии и ревматологии имени Э.Э. Эйхвальда, Санкт-Петербург, Россия

Назаров Петр Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Недоспасов Сергей Артурович – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии МГУ им. М.В. Ломоносова и заведующий отделом молекулярной иммунологии в Институте физико-химической биологии им. Белозерского МГУ, Москва, Россия

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Редактор перевода:
д.м.н. Чухловин А.Б.

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 03.12.2021 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 27,75. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 147

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

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

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

November-December

2021, volume 23

No. 6

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 03.12.2021. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 27.75. 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

Тыщук Е.В., Михайлова В.А., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРЫ: ПРОИСХОЖДЕНИЕ, ФЕНОТИП, ФУНКЦИИ 1207

Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Носков А.К.

РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ КОРОНАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ 1229

Саидов М.З.

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ИНФИЛЬТРАТА ПРИ ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ 1239

Мачарадзе Д.Ш.

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ И ТРИПТАЗА. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ 1271

Чернов А.Н., Орлов Д.С., Шамова О.В.

ПЕПТИДЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АГЕНТЫ: ПЛЮСЫ И МИНУСЫ 1285

Глазанова Т.В., Шилова Е.Р., Чечеткин А.В., Бубнова Л.Н.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТРАНСФУЗИЙ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ РЕЦИПИЕНТА 1307

Оригинальные статьи

Савченко А.А., Гриценко О.Д., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Мастерова А.А., Шестерня П.А.

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА Т-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ АНКИЛОЗИРУЮЩИМ СПОНДИЛИТОМ НА ФОНЕ ГЕНО-ИНЖЕНЕРНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ 1319

Сенникова С.В., Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Акулова С.С.

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОНУКЛЕАРОВ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ВЕНОЗНОЙ И КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ 1333

Оспельникова Т.П., Денисов А.А., Черевко Н.А., Кузьмина В.В., Дмитрук В.С., Нагайцева Д.С., Каргов И.С.

ОСОБЕННОСТИ СПЕКТРА ЦИТОКИНОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕ 1347

Черемохин Д.А., Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Власова Е.В., Никитина Н.В., Болков М.А.

ВАРИАТИВНОСТЬ СИМПТОМОКОМПЛЕКСА SATCN-22 В РАМКАХ СИНДРОМА ДЕЛЕЦИИ 22q11.2 1357

Корнева Е.А., Дмитриенко Е.В., Миямура С., Акимото Н., Нода М.

ПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРЕПАРАТА НУКЛЕОТИДНОЙ ПРИРОДЫ «ДЕРИНАТ» НА ТЕЧЕНИЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ 1367

Краткие сообщения

Михайлова В.А., Гребенкина П.В., Тыщук Е.В., Давыдова А.А., Загайнова В.А., Коган И.Ю., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ НК-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С КЛЕТКАМИ ТРОФОБЛАСТА И ЦИТОКИНАМИ IL-15 И IL-18 1383

Мудров В.П., Давыдова Н.В., Мишина Т.Е., Казаков С.П.

ЛОКАЛЬНЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАРОДОНТИТЕ 1389

Иммунологические методы

Белякова В.В., Майорова О.А., Иванова Н.В., Степанова И.Е., Смердова М.А., Обрядина А.П., Топтыгина А.П.

ОЦЕНКА СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ НА АНТИТЕЛА К РАЗЛИЧНЫМ АНТИГЕНАМ ВИРУСА SARS-CoV-2. СОПОСТАВЛЕНИЕ ШЕСТИ ТЕСТ-СИСТЕМ 1395

Точка зрения

Корсунский И.А.

НАСТОРАЖИВАЮЩИЕ ПРИЗНАКИ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ: ЕСТЬ ЛИ ПОЛЬЗА? 1405

Рецензия 1415

Правила для авторов 1419

Авторский указатель 1422

Предметный указатель 1422

CONTENTS

Reviews

Tyshchuk E.V., Mikhailova V.A., Selkov S.A., Sokolov D.I.

NATURAL KILLER CELLS: ORIGIN, PHENOTYPE, FUNCTION 1207

Ivanova I.A., Omelchenko N.D., Filippenko A.V., Trufanova A.A., Noskov A.K.

ROLE OF THE CELLULAR IMMUNITY IN THE FORMATION OF THE IMMUNE RESPONSE IN CORONAVIRUS INFECTIONS 1229

Saidov M.Z.

PATHOGENETIC VALUE OF CELL INFILTRATE IN IMMUNOINFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES 1239

Macharadze D.Sh.

MAST CELLS AND TRYPTASE. MODERN ASPECTS 1271

Chernov A.N., Orlov D.S., Shamova O.V.

PEPTIDES OF THE INNATE IMMUNITY AS POTENTIAL ANTICANCER AGENTS: PROS AND CONS 1285

Glazanova T.V., Shilova E.R., Chechetkin A.V., Bubnova L.N.

IMPACT OF TRANSFUSION OF BLOOD COMPONENTS ON THE RECIPIENT IMMUNE SYSTEM 1307

Original articles

Savchenko A.A., Gritsenko O.D., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Serebriakova M.K., Masterova A.A., Shesternya P.A.

FEATURES OF T LYMPHOCYTE SUBPOPULATION PROFILE IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS UNDERGOING GENETICALLY ENGINEERED BIOLOGICAL THERAPY 1319

Sennikova S.V., Toptygina A.P., Semikina E.L., Zakirov R.Sh., Akulova S.S.

MONONUCLEAR SUBSETS AND CYTOKINE PROFILE OF VENOUS AND CAPILLARY BLOOD IN PATIENTS WITH PSORIASIS AND HEALTHY PEOPLE 1333

Ospelnikova T.P., Denisov A.A., Cherevko N.A., Kuzmina V.V., Dmitruk V.S., Nagaitseva D.S., Kargov I.S.

FEATURES OF CYTOKINE SPECTRUM IN CHRONIC URTICARIA 1347

Cheremokhin D.A., Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Vlasova E.V., Nikitina N.V., Bolkov M.A.

VARIABILITY OF CATCH-22 SYMPTOME COMPLEX WITHIN THE FRAMEWORK OF 22q11.2 DELETION SYNDROME 1357

Korneva E.A., Dmitrienko E.V., Miyamura S., Akimoto N., Noda M.

PROTECTIVE EFFECTS OF DERINAT, A NUCLEOTIDE-BASED DRUG, ON EXPERIMENTAL TRAUMATIC BRAIN INJURY, AND ITS CELLULAR MECHANISMS 1367

Short communications

Mikhailova V.A., Grebenkina P.V., Tyshchuk E.V., Davydova A.A., Zagaynova V.A., Kogan I.Yu., Selkov S.A., Sokolov D.I.

PHENOTYPIC PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD NK CELLS UNDER CULTURING WITH TROPHOBLAST CELLS AND IL-15 AND IL-18 CYTOKINES 1383

Mudrov V.P., Davidova N.V., Mishina T.E., Kazakov S.P.

LOCAL CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN CHRONIC PERIODONTITIS 1389

Immunological methods

Belyakova V.V., Maiorova O.A., Ivanova N.V., Stepanova I.E., Smerdova M.A., Obryadina A.P., Toptygina A.P.

ASSESSMENT OF SEROLOGICAL TESTS FOR ANTIBODIES TO DIFFERENT ANTIGENS OF THE SARS-CoV-2 VIRUS: COMPARISON OF SIX IMMUNOASSAYS 1395

Point of view

Korsunskiy I.A.

WARNING SIGNS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES: ARE THERE ANY BENEFITS? 1405

Book review 1415

Instructions to Authors 1419

Author index 1422

Subject index 1422

ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРЫ: ПРОИСХОЖДЕНИЕ, ФЕНОТИП, ФУНКЦИИ

Тыщук Е.В.¹, Михайлова В.А.^{1, 2}, Сельков С.А.^{1, 2}, Соколов Д.И.^{1, 2}

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

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. НК-клетки (от Natural killer), или естественные киллеры, представляют собой группу лимфоцитов врожденного иммунитета, образующихся в костном мозге. Выделение НК-клеток в отдельную популяцию лимфоцитов связано с открытием их способности индуцировать гибель опухолевых клеток без предварительной сенсibilизации. В настоящем обзоре предпринята попытка систематизации представленных в литературе многочисленных данных о биологии НК-клеток. Авторами рассмотрены этапы дифференцировки НК-клеток из общего лимфоидного предшественника (CLP) в костном мозге, описаны две функционально различные популяции зрелых НК-клеток – CD56^{bright}CD16⁻ и CD56^{dim}CD16⁺. Кроме того, обсуждается роль цитокинов и хемокинов в развитии НК-клеток. В обзоре собраны данные о спектре экспрессируемых НК-клетками адгезионных молекул (LFA-1, LFA-2, LFA-3; α M β 2, α X β 2, L-selectin, VLA-4, VLA-5; PECAM-1; CEACAM-1), цитокиновых рецепторов (IL-1R, IL-2ra, IL-2Rb/IL-2Rc, IL-6R α , IL-7Ra, IL-8R, IL-10R, IL-12R β 1, IL-15ra, IL-18R, IL-21ra, IFNGR2, TGFBR, c-Kit, CXCR1, CXCR3, CXCR4, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, IChemR23, CX3CR1), а также рецепторов, регулирующих активность НК-клеток (LILRB1, LILRB2, LILRB4; KIR2DL1-5; KIR2DS1-5; KIR3DL1-3; KIR3DS1; NKG2A, NKG2C, NKG2D; Siglec7, Siglec9; CD16; NKRP-1; TIGIT; TACTILE; NKp30, NKp44, NKp46, NKp80; LAIR-1; PD-1; TIM-3; 2B4; TLR1-9). Авторами также рассмотрены механизмы реализации НК-клетками цитотоксической активности, в том числе за счет экспрессии МНС-I-специфических рецепторов, Fc-рецепторов CD16, взаимодействия рецепторов и лигандов апоптоза (Fas-FasL и TRAIL-TRAILR), а также других рецепторов. В обзоре подробно описано строение иммунологического синапса между НК-клеткой и клеткой-мишенью, рецепторные взаимодействия и роль цитоскелета при его формировании. Помимо активирующего иммунологического синапса, в обзоре описывается ингибирующий вариант, а также приведен пример регуляции активности НК-клеток посредством ингибирующего синапса. Авторами суммированы данные о способах экзоцитоза литических гранул НК-клетками, включающих полное или частичное слияние везикул с плазматической мембраной, экзоцитоз везикул, содержащих перфорин и FasL, и образование микровезикул, содержащих гранзим В. В обзоре описаны данные о способности НК-клеток сохранять активированное состояние в течение продолжительного времени, а также поддерживать контакт одновременно с несколькими мишенями. Помимо функций, свойственных естественным киллерам как клеткам врожденного иммунитета, авторы указывают на их способность

Адрес для переписки:

Тыщук Елизавета Владимировна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (931) 963-85-78.
E-mail: tyshhuk.elizaveta@gmail.com

Address for correspondence:

Tyshchuk Elizaveta V.
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
199034, Russian Federation, St. Petersburg, Mendeleevskaya line, 3.
Phone: 7 (931) 963-85-78.
E-mail: tyshhuk.elizaveta@gmail.com

Образец цитирования:

Е.В. Тыщук, В.А. Михайлова, С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Естественные киллеры: происхождение, фенотип, функции» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1207-1228.
doi: 10.15789/1563-0625-NKC-2330
© Тыщук Е.В. и соавт., 2021

For citation:

E.V. Tyshchuk, V.A. Mikhailova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov "Natural killer cells: origin, phenotype, function", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1207-1228.
doi: 10.15789/1563-0625-NKC-2330
DOI: 10.15789/1563-0625-NKC-2330

проявлять черты клеток адаптивного иммунитета. В целом, разнообразие механизмов, регулирующих активность НК-клеток, дополняет специфические функции лимфоцитов, что делает работу иммунной системы более эффективной.

Ключевые слова: НК-клетки, дифференцировка, рецепторы, цитотоксичность, иммунологический синапс, цитокины

NATURAL KILLER CELLS: ORIGIN, PHENOTYPE, FUNCTION

Tyshchuk E.V.^a, Mikhailova V.A.^{a, b}, Selkov S.A.^{a, b}, Sokolov D.I.^{a, b}

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

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

Abstract. Natural killer cells (NK) are innate immune lymphocytes produced in the bone marrow. Isolation of NK cells as a separate population of lymphocytes is related to discovery of their ability to induce the death of tumor cells without prior sensitization. In this review, an attempt was made to systematize the numerous data on the biology of NK cells presented in the literature. The authors consider the stages of NK cells' differentiation from a common lymphoid progenitor (CLP) in the bone marrow, describe two functionally different populations of mature NK cells — CD56^{bright}CD16⁻ and CD56^{dim}CD16⁺. In addition, the role of cytokines and chemokines in the development of NK cells is discussed. The review includes data on the spectrum of molecules expressed by NK cells: adhesion molecules (LFA-1, LFA-2, LFA-3; α M β 2, α X β 2, L-selectin, VLA-4, VLA-5; PECAM-1; CEACAM-1), cytokine receptors (IL-1R, IL-2ra, IL-2Rb/IL-2Rc, IL-6R α , IL-7Ra, IL-8R, IL-10R, IL-12R β 1, IL-15ra, IL-18R, IL-21ra, IFNGR2, TGFBR, c-Kit, CXCR1, CXCR3, CXCR4, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, IChemR23, CX3CR1), as well as receptors that regulate the activity of NK cells (LILRB1, LILRB2, LILRB4; KIR2DL1-5; KIR2DS1-5; KIR3DL1-3; KIR3DS1; NKG2A, NKG2C, NKG2D; Siglec7, Siglec9; CD16; NKRP-1; TIGIT; TACTILE; NKp30, NKp44, NKp46, NKp80; LAIR-1; PD-1; TIM-3; 2B4; TLR1-9). The authors also examine the mechanisms of implementing cytotoxic activity by NK cells, including cytotoxicity, via expression of MHC-I-specific receptors, CD16 Fc receptors, receptors and ligands of apoptosis (Fas-FasL and TRAIL-TRAILR) as well as other receptors. The review describes in detail the structure of immunological synapse between the NK cell and target cell, receptor interactions, and the role of the cytoskeleton in its formation. The data are summarized on the variants of exocytosis of lytic granules by NK cells, including complete or partial fusion of vesicles with the plasma membrane, exocytosis of vesicles containing perforin and FasL, and the formation of microvesicles containing granzyme B. The review also describes data on ability of NK cells to maintain activated state for a long time, as well as to maintain contact with several targets at the same time. In addition to the functions inherent in natural killers as cells of innate immunity, the authors point out their ability to exhibit the features of cells of adaptive immunity. In general, a variety of mechanisms that regulate the activity of NK cells may complement the specific functions of lymphocytes, thus making the immune system more efficient.

Keywords: NK cells, differentiation, receptors, cytotoxicity, immunological synapse, cytokines

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-15-00021.

Введение

НК-клетки (от Natural killers), или естественные киллеры, представляют собой группу лимфоцитов врожденного иммунитета, обладающих цитотоксической активностью [21, 46]. Изначально НК-клетки привлекли к себе внимание благодаря возможности убивать опухолевые клетки без предварительной сенсibilизации. Позже было выяснено, что, помимо этого, они атакуют инфицированные вирусом клетки, выделяют цитокины, регулируя таким образом активность других иммунных клеток, а также играют

важную роль при беременности [43, 78]. Одной из особенностей НК-клеток является способ распознавания ими своих мишеней. Полагают, что они детектируют инфицированные и измененные клетки по принципу «отсутствия своего». Это означает, что естественные киллеры реагируют на отсутствие на поверхности клеток молекул главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС-I), которые в норме экспрессируются на поверхности здоровых клеток [78]. Для лучшего понимания особенностей естественных киллеров, необходимо рассмотреть путь их развития.

Происхождение НК-клеток

Естественные киллеры происходят из общего лимфоидного предшественника (CLP) в костном мозге. Общий лимфоидный предше-

ственик дает начало нескольким популяциям клеток: про-В- и пре-Т-лимфоцитам, клеткам-предшественникам лимфоцитов врожденного иммунитета (ILC) и линии предшественников NK-клеток (NKP) [2, 6, 32]. Каждый этап созревания клетки можно отследить благодаря маркерам, экспрессируемым на цитоплазматической мембране. Однако в литературе не удается найти единой классификации всех стадий дифференцировки NK-клеток, особенно ранних этапов. В связи с этим возможны некоторые различия в названиях стадий дифференцировки NK-клеток, а также в рецепторах, характеризующих ту или иную стадию. В литературе описано, что изначально гемопоэтическая стволовая клетка (HSC) имеет фенотип $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD133}^+ \text{CD45RA}^- \text{CD38}^{\text{dim}} \text{CD244}^+ \text{CD10}^-$ [6, 81]. Затем HSC образует клетку-предшественник лимфоидных клеток, которая экспрессирует CD45RA^+ [6]. Впоследствии от нее отделяется общий лимфоидный предшественник (CLP), который обладает фенотипом $\text{CD34}^+ \text{CD45RA}^+ \text{CD38}^+ \text{CD7}^+ \text{CD10}^+$. Затем CLP последовательно образует несколько последовательных стадий предшественников ILC, после чего от общего предшественника ILC отделяется клетка-предшественник NK-клеток (NKP) [80]. Экспрессия молекулы CD122 (IL-2R β) определяет отделившуюся линию NK-клеток, а появление на поверхности такой клетки CD56 сообщает о превращении незрелой NK-клетки в зрелую [6, 105]. Зрелая NK-клетка приобретает свойственные ей поверхностные маркеры, включая MHC-связывающие рецепторы, например, CD94/NKG2A и иммуноглобулиноподобные рецепторы (KIR) [40].

Выделяют две функционально различные подгруппы NK-клеток: $\text{CD56}^{\text{bright}} \text{CD16}^-$ и $\text{CD56}^{\text{dim}} \text{CD16}^+$. Ранее мы описывали особенности дифференцировки данных популяций NK-клеток [81]. Развитие и происхождение этих двух подгрупп не до конца изучены. Полагают, что $\text{CD56}^{\text{bright}}$ популяция является первичной и дает начало CD56^{dim} популяции. Этот переход может быть связан с активацией определенных транскрипционных факторов, что нами также было рассмотрено ранее [80]. Кроме того, о дифференцировке CD56^{dim} популяции из $\text{CD56}^{\text{bright}}$ свидетельствует локализация $\text{CD56}^{\text{bright}}$ NK-клеток во вторичных лимфоидных органах, где в норме находятся «дозревающие» клетки. Кроме того, по количеству они превосходят популяцию CD56^{dim} в тканях новорожденных. После рождения количество CD56^{dim} NK-клеток постепенно увеличивается, а основной их пул находится в циркуляции [133]. Также предполагается, что незрелые NK-клетки могут напрямую давать популяцию CD56^{dim} NK-клеток, однако эти данные недостаточно хорошо изучены [6]. Популяция $\text{CD56}^{\text{bright}}$

преимущественно продуцирует цитокины, а перфорин и гранзимы в таких клетках синтезируются слабо [31, 85]. Популяция CD56^{dim} , напротив, обладает высокой цитотоксической активностью и синтезирует большое количество литических гранул. Эти NK-клетки способны к активному синтезу цитокинов после активации через различные рецепторы. Преобладающее число CD56^{dim} клеток находится в циркуляции [31, 85].

Модель дифференцировки NK-клеток не является линейной. Кроме того, наличие маркеров, перечисленных выше, не всегда обязательно в ходе созревания, например, отсутствие CD10 и CD7 снижает интенсивность развития NK-клеток, но не останавливает его [21]. В зависимости от локализации фенотип NK-клеток и ответ на стимуляцию цитокинами может варьировать [85]. Так, ранее нами рассмотрены особенности фенотипических и функциональных характеристик NK-клеток матки [2, 4, 81].

Местом созревания естественных киллеров традиционно считался костный мозг, но недавние исследования предполагают наличие других вариантов. Развитие NK-клеток из их CD34^+ предшественников обнаружено в миндалинах, пуповинной крови и в тканях плода [105]. Предшественники естественных киллеров также были найдены в децидуальной оболочке. Предполагается, что они развиваются в зрелые NK-клетки благодаря децидуальному микроокружению [121].

Говоря о развитии естественных киллеров, необходимо упомянуть о клеточном микроокружении, которое влияет на созревание NK-клеток за счет выделения цитокинов. Одним из самых важных цитокинов, необходимых для развития NK-клеток, является IL-15, который экспрессируется клетками стромы костного мозга, тимуса, лимфатических узлов, а также продуцируется клетками крови, такими как дендритные клетки и макрофаги [30, 40]. Кроме того, мРНК IL-15 конститутивно экспрессирован во многих органах, например, в плаценте, скелетных мышцах, почках [30]. Помимо IL-15, в ходе развития естественных киллеров важную роль играют цитокины IL-21 и IL-2. Их функция заключается в усилении пролиферации активированных NK-клеток, а также продукции у них литических молекул, содержащих перфорин и гранзимы [6]. SCF и Flt3-L — молекулы, контролирующие выживание и пролиферацию молодых NK-клеток. Так, Flt3-L индуцирует экспрессию β -цепи, общую для рецепторов IL-2 и IL-15, вследствие чего развивающиеся естественные киллеры приобретают способность взаимодействовать с этими цитокинами [85]. IL-7 — еще один цитокин, необходимый для развития NK-клеток на ранних стадиях [6].

Хемокины — группа цитокинов, которая не только участвует в развитии лимфоцитов, но и обеспечивает их распределение в организме. На начальных этапах развития в костном мозге НК-клетки экспрессируют высокие уровни рецептора CXCR4. Высокое содержание этого рецептора на поверхности НК-клеток может усиливать ответ на IL-15, стимулируя таким образом пролиферацию и дифференцировку. В то же время взаимодействие CXCR4 с лигандом CXCL12 влияет на дифференцировку НК-клеток на поздних стадиях развития [16]. Постепенно уровень CXCR4 снижается, и НК-клетка может взаимодействовать с другими лигандами. Например, рецептор к сфингозину S1P5 связывает сфингозин S1P. Это взаимодействие стимулирует зрелые НК мигрировать из костного мозга [16, 133]. В дальнейшем, в зависимости от хемокиновых рецепторов, экспрессируемых на поверхности, естественные

киллеры находятся в циркуляции или заселяют лимфоидные органы и другие ткани.

В целом НК-клетки можно назвать достаточно однородной популяцией, однако и среди них выделяют подгруппы клеток, несущих разный набор поверхностных рецепторов и выполняющих разные задачи.

Фенотип зрелых НК-клеток

Естественные киллеры взаимодействуют с другими клетками за счет поверхностных рецепторов, которые можно разделить на несколько групп: адгезионные рецепторы, рецепторы для цитокинов, активирующие и ингибирующие рецепторы, рецепторы, индуцирующие апоптоз, и другие.

Молекулы адгезии

НК-клетки несут молекулы клеточной адгезии — белки, обеспечивающие связывание с другими клетками и внеклеточным матриксом (табл. 1). Наличие адгезионных молекул, в част-

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ АДГЕЗИОННЫХ МОЛЕКУЛ НК-КЛЕТКАМИ

TABLE 1. EXPRESSION OF ADHESION MOLECULES BY NK CELLS

Рецептор Receptor	Кластер дифференцировки Cluster of differentiation	Лиганды Ligands
LFA-1	CD11a/CD18 [13, 85]	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 [24, 25, 85]
LFA-2	CD2 [85]	CD58, CD48 [85]
LFA-3	CD58 [3, 85]	CD2 [85]
α M β 2 (Mac-1)	CD11b/CD18 [3, 85]	C3bi, фибриноген, x factor, ICAM-4 [85] ICAM-1 [25, 33], ICAM-2 [33], ICAM-3 [122] C3bi, fibrinogen, x factor, ICAM-4 [85] ICAM-1 [25, 33], ICAM-2 [33], ICAM-3 [122]
α X β 2	CD11c/CD18 [3, 85]	C3bi, фибриноген, ICAM-1 [85] C3bi, fibrinogen, ICAM-1 [85]
N-CAM	CD56 [85]	FGFR1 [85]
Human NK-1 (HNK-1)	CD57 [85]	– [85]
L-selectin	CD62L [85]	GLyCAM-1, MadCAM-1 [85] CSPG2 [131]
VLA-4	CD49d/CD29 [3, 128]	Фибронектин [45], VCAM-1 [29, 102] Fibronectin [45], VCAM-1 [29, 100]
VLA-5	CD49e/CD29 [62]	Фибронектин [45] Fibronectin [45]
PECAM-1	CD31 [3, 129]	PECAM-1 [22]
CEACAM-1	CD66a [66]	CEACAM-1 [78]

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ НК-КЛЕТКАМИ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНОВ

TABLE 2. EXPRESSION OF CYTOKINE RECEPTORS BY NK CELLS

Рецептор Receptor	Кластер дифференцировки Cluster of differentiation	Лиганды Ligands
IL-1R		IL-1 β [52]
IL-2ra	CD25 CD122/CD132 [85]	IL-2 [85]
IL-2Rb/IL-2Rc	CD122/CD132 [85]	IL-2 и IL-15 [85]
IL-6R α	CD126 [79]	IL-6 [52]
IL-7ra	CD127 [85]	IL-7 [85]
IL-8R	CXCR1, CD181 [76]	IL-8 [130]
IL-10R	CD210 [84]	IL-10 [52]
IL-12R β 1	CD212 [74]	IL-12 [52]
IL-15ra	CD215 [69]	IL-15 [52]
IL-18R	CD218a [85]	IL 18 [85]
IL-21ra	CD360 [71]	IL-21 [52]
IFNGR2		IFN γ [103]
TGF-BR		TGF- β [104]
c-Kit	CD117 [85]	SCF (KL) [85]
CXCR1	CD128 [85]	IL8 [85]
CXCR3	CD183 [85]	CXCL9, CXCL10, CXCL11 [85]
CXCR4	CD184 [85]	CXCL2 [85], CXCL12 [15]
CCR4	CD194 [85]	CCL2, MIP-1b (CCL4), RANTES, CCL17, CCL22 [85]
CCR5	CD195 [17]	CCL4, RANTES, CCL20 [17]
CCR6	CD196 [135]	CCL20 [15]
CCR7	CD197 [85]	CCL19, CCL21 [85]
ICChemR23		Хемерин [85] Chemerin [85]
CX3CR1		Фракталин [85] Fractalkine [85]

ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИЯ НК-КЛЕТКАМИ РЕЦЕПТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ИХ АКТИВНОСТЬ

TABLE 3. EXPRESSION OF RECEPTORS BY NK CELLS THAT REGULATE THEIR ACTIVITY

Рецептор Receptor	Кластер дифференцировки Cluster of differentiation	Лиганды Ligands	Сигнальный путь Signal pathway	Результат взаимодействия НК с лигандом Result of interaction
LIRB1/ILT2	CD85J [51]	HLA-I, UL-18 (CMV) [85]	ITIM-модуль / ITSM [51] ITIM-motif / ITSM [51]	Ингибирование [85] Inhibition [85]
LIRB2/ILT4	CD85D [51]	HLA-I [90]	ITIM-модуль [51] ITIM-motif [51]	Ингибирование [51] Inhibition [51]
LILRB4/ILT3	CD58K [66]	HLA-I [66]	ITIM-модуль [61] ITIM-motif [61]	Ингибирование [66] Inhibition [66]
KIR2DL1	CD158a [85]	HLA-C2 (C*02, C*04, C*05, C*06) [90]	ITIM-модуль [1] ITIM-motif [1]	Ингибирование [85] Inhibition [85]
KIR2DL2/3	CD158b [85]	HLA-C1 (C*01, C*03, C*07, C*08 HLA-C2 (C*0501, C*0202, C*0401) HLA-B (B*4601, B*7301) [90]	ITIM-модуль [1] ITIM-motif [1]	Ингибирование [85] Inhibition [85]
KIR2DL4	CD158d [85]	HLA-G [90]	FcεRIγ / ITIM- модуль [1] FcεRIγ / ITIM-motif [1]	Активация / Ингибирование [85] Activation / Inhibition [85]
KIR2DL5A/B	CD158f [85]	– [90]	ITIM-модуль [1] ITIM-motif [1]	Ингибирование [85] Inhibition [85]
KIR2DS1	CD158h [85]	HLA-C2 (C*02, C*04, C*05, C*06) [90]	DAP12 [1]	Активация [85] Activation [85]
KIR2DS2	CD158j [85]	HLA-A*1101, HLA-C C1 (слабо) [90]	DAP12 [1]	Активация [85] Activation [85]
KIR2DS3	CD158j [85]	– [90]	DAP12 [1]	Активация [85] Activation [85]
KIR2DS4	CD158i [85]	HLA-A*1102 HLA-C (C*0501, C*1601, C*0202) [90]	DAP12 [1]	Активация [85] Activation [85]
KIR2DS5	CD158f [85]	– [90]	DAP12 [1]	Активация [85] Activation [85]
KIR3DL1	CD158e1 [85]	HLA-A (A*24, A*23, A*32) HLA-B (B*08, B*27, B*57, B*58) [90]	ITIM-модуль [1] ITIM-motif [1]	Ингибирование [85] Inhibition [85]
KIR3DL2	CD158k [85]	HLA-A (A*03, A*11) HLA-B27, HLA-F [90] CpG-ODN [85]	ITIM-модуль [1] ITIM-motif [1]	Ингибирование [85] Inhibition [85]
KIR3DL3	CD158z [1]	– [90]	ITIM-модуль [1] ITIM-motif [1]	Ингибирование [1] Inhibition [1]
KIR3DS1	CD158e2 [85]	HLA-B*5701, HLA-F [90]	DAP12 [1]	Активация [85] Activation [85]

Таблица 3 (продолжение)
Table 3 (continued)

Рецептор Receptor	Кластер дифференцировки Cluster of differentiation	Лиганды Ligands	Сигнальный путь Signal pathway	Результат взаимодействия НК с лигандом Result of interaction
NKG2A/KLRD-1	CD159a/CD94 [85]	HLA-E [85]	ITIM-модуль [1] ITIM-motif [1]	Ингибирование [85] Inhibition [85]
NKG2C/KLRD-1	CD159c/CD94 [85]	HLA-E [85]	DAP12 [1]	Активация [85] Activation [85]
NKG2D	CD314 [85]	MICA, MICB, ULBPs [85]	DAP10 [1]	Активация [85] Activation [85]
IRp60	CD300a [85]	Репорбид вирус, α-герпесвирус фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин [108] Pseudorabide virus, α-herpesvirus, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine [108]	ITIM-модуль [1] ITIM-motif [1]	Ингибирование [85] Inhibition [85]
p75/AIRM1 (Siglec7)	CD328 [85]	Терминальные остатки сиаловой кислоты (Neu5Acα2-8NeuAc) [1] Terminal sialic acid residues (Neu5Acα2-8NeuAc) [1]	ITIM-модуль [1] ITIM-motif [1]	Ингибирование [85] Inhibition [85]
Siglec9	CD329 [1]	Терминальные остатки сиаловой кислоты (Neu5Acα2-8NeuAc) [1] Terminal sialic acid residues (Neu5Acα2-8NeuAc) [1]	ITIM-модуль [1] ITIM-motif [1]	Ингибирование [1] Inhibition [1]
FcγRIII	CD16 [85]	IgG [85]	FcεRIγ, CD3ζ [1]	Активация [85] Activation [85]
NKRP-1	CD161 [85]	LLT-1 [85]		Активация [85] Activation [85]
DNAM-1	CD226 [85]	Нектин-2 (CD112) PVR (CD155) [85] Nectin-2 (CD112) PVR (CD155) [85]		Активация [85] Activation [85]
TIGIT		Нектин-2 (CD112), PVR (CD155) [106], возможно, нектин-3 (CD113) [115] Nectin-2 (CD112) PVR (CD155) [108] possibly, nectin-3 (CD113) [115]	ITIM- и ITT-like модуль [108] ITIM- and ITT-like motif [108]	Ингибирование [108] Inhibition [108]
TACTILE	CD96 [108]	PVR (CD155), CD111 [108]	ITIM-модуль [108] ITIM-motif [108]	Ингибирование [108] Inhibition [108]
PVRIG	CD112R [108]	Нектин-2 (CD112) [108] Nectin-2 (CD112) [108]		Ингибирование [108] Inhibition [108]

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

Рецептор Receptor	Кластер дифференцировки Cluster of differentiation	Лиганды Ligands	Сигнальный путь Signal pathway	Результат взаимодействия НК с лигандом Result of interaction
TIM-3		Ceacam-1 [108]		Ингибирование [108] Inhibition [108]
LAG-3	CD223 [115]	LSEctin [108]	KIEELE-мотив [115] KIEELE-motif [115]	Ингибирование [108] Inhibition [108]
PD-1	CD279 [115]	PD-L1 (CD274), PD-L2 (CD273) [115]	ITIM- и ITSM-модуль [115] ITIM- and ITSM-motif [115]	Ингибирование [108] Inhibition [108]
2B4	CD244 [85]	CD48 [85]	SAP / EAT-4 / ITSM-модуль [1] SAP/EAT-4/ITSM-motif [1]	Активация / Ингибирование [1] Activation / Inhibition [1]
NTB-A	CD352 [85]	NTB-A [85]	SAP / EAT-4 / ITSM-модуль [1] SAP / EAT-4 / ITSM-motif [1]	Активация / Ингибирование [1] Activation / Inhibition [1]
CRACC	CD319 [1]	CRACC [1]	SAP / EAT-4 / ITSM-модуль [1] SAP / EAT-4 / ITSM-motif [1]	Активация / Ингибирование [1] Activation / Inhibition [1]
NKp46	CD335 [85]	Вирусный HA HN [85] Viral HA HN [85]	FcεRIγ, CD3ζ [1]	Активация [85] Activation [85]
NKp44	CD336 [85]	Вирусный HA HN [85] Viral HA HN [85]	DAP12 [1]	Активация [85] Activation [85]
NKp30	CD337 [85]	B7-H6 [85]	FcεRIγ, CD3ζ [1]	Активация [85] Activation [85]
NKp80		AICL (activation-induced C-type lectin) [85]	HemITAM-модуль [1] HemITAM-motif [1]	Активация [85] Activation [85]
LAIR-1	CD305 [1]	Коллаген [1] Collagen [1]	ITIM-модуль [1] ITIM-motif [1]	Ингибирование [1] Inhibition [1]
KLRG1/MAFA		Кадгеринины [1] Cadherins [1]	ITIM-модуль [1] ITIM-motif [1]	Активация [1] Activation [1]
TLR с 1 по 9		Флагеллин, ssРНК, липопептиды и липопо- лисахариды мембран бактерий [60] Flagellin, ssRNA, lipopeptides and lipopolysaccharides of bacterial membranes [60]	NF-κB, IRF [14] MyD88, TIRAP / Mal, Tollip [117]	Активация [8] Activation [8]

ности LFA-1, необходимо при дифференцировке естественных киллеров [86]. Кроме того, эти молекулы (LFA-1, Mac-1) позволяют НК-клеткам связываться с мишенями, активировать-

ся и формировать иммунологический синапс [92, 120]. Экспрессия у CD16⁺ НК-клеток молекулы L-selectin и наличие ее лигандов (MADCAM1, CSPG2) на клетках эндометрия делает возмож-

ным привлечение этой популяции киллеров в матку из периферической крови [131].

Экспрессия NK-клетками рецепторов для цитокинов определяет способность отвечать на их воздействие (табл. 2). Следует отметить, что несмотря на наличие в литературе сведений о широком спектре цитокинов, влияющих на естественные киллеры, не всегда исследователи указывают на наличие рецепторов для этих цитокинов на цитоплазматической мембране.

В зависимости от экспрессии определенных хемокиновых рецепторов, NK-клетки способны мигрировать в разные органы и ткани. Например, циркулирующие клетки CD56^{bright}CD16⁻ направляются в лимфатические узлы, поскольку экспрессируют хоминг-рецептор CCR7, лигандами которого являются CCL19 и CCL21 [20, 68]. Циркулирующие клетки CD56^{bright}CD16⁻ мигрируют в матку, куда их привлекают хемокины CXCL10 и CXCL12 [68]. Клетки CD56^{dim}CD16⁺, экспрессирующие рецепторы к хемерину, CXCR1, и CX3CR1, направляются в воспалительные центры периферических тканей по градиенту их лигандов [110]. Установлено, что на киллерах в печени и лимфоидных тканях экспрессируются рецепторы CXCR6 и CCR5 [20]. Было показано, что СС-хемокины мобилизуют ионы кальция и стимулируют высвобождение цитолитических гранул у естественных киллеров, а также регулируют их адгезивность [89].

Роль интерлейкинов в процессе дифференцировки и пролиферации естественных киллеров была описана ранее [81], однако зрелые клетки также подвергаются их действию. Цитокины IL-2, IL-15, IL-18, IL-21 вызывают активацию у NK-клеток цитотоксической функции [52]. Опухолевые клетки способны выделять IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-23, IL-35, TGF- β , регулируя тем самым активность NK-клеток [52, 130]. В условиях опухолевого роста IL-6 и IL-8 запускают STAT-3 путь сигналинга в NK-клетках, что ведет к снижению у них экспрессии активирующих рецепторов NKp30 и NKG2D [130]. IL-6 в опухолях также регулирует экспрессию провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α и запускает синтез антагонистов их рецепторов, подавляя воспаление [52]. Показано, что вместе IL-6 и IL-10 способствуют пролиферации опухолевых клеток, их выживанию и метастазированию, стимулируют секрецию ими ангиогенных факторов VEGF и FGF, одновременно подавляя активность естественных киллеров [52]. IL-10 обладает прямым ингибирующим действием в отношении NK-клеток, ограничивая синтез ими некоторых провоспалительных цитокинов, включая TNF α и IL-6 [100]. IL-10 также может оказывать косвенное ингибирующее воздействие на про-

дукцию NK-клетками IFN γ и TNF α , подавляя секрецию антигенпрезентирующими клетками IL-12, IL-15 и IL-18 [52]. Следует отметить, что экспрессия рецепторов для IFN γ (IFNGR2) обнаружена только у некоторых популяций естественных киллеров [103]. TGF- β – цитокин, секретируемый различными клетками, в том числе раковыми, влияет на дифференцировку и развитие NK-клеток, а также негативно воздействует на их активность [9, 134]. Механизмы угнетения киллеров запускают трансформирование NK-клеток в другие ILC, подавление метаболических процессов, снижение экспрессии активирующих рецепторов NKp30 и NKG2D [9, 104]. TGF- β -опосредованное ингибирование гликолиза нарушает продукцию IFN γ NK-клетками, а угнетение окислительного фосфорилирования отрицательно сказывается на их цитотоксических функциях [134]. Кроме того, на пролиферацию и цитотоксические функции NK-клеток отрицательно влияет депривация триптофана, вызванная индоламин-2,3-диоксигеназой [41, 64].

В зависимости от клеточного микроокружения и установившейся цитокиновой сети естественные киллеры могут по-разному отвечать на действие цитокинов. Например, при взаимодействии NK-клеток с дендритной клеткой последняя за счет продукции IL-1 β инициирует экспрессию NK-клеткой CD95 и способна через этот рецептор ввести NK-клетку в апоптоз, контролируя тем самым активность естественных киллеров [119]. С другой стороны, установлено, что макрофаги M1 за счет продукции IL-1 β способны активировать NK-клетку, стимулируя экспрессию NKp44 [72]. Естественные киллеры и сами могут вносить вклад в создание локальной цитокиновой сети, аутокринно и паракринно регулируя собственные взаимоотношения с мишенями. Установлено, что активация NK-клеток через KIR2DL4 стимулирует продукцию ими хемокинов и цитокинов, включая IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-6 и IL-8, которые могут прямо или косвенно способствовать ремоделированию сосудов, воздействуя на другие типы клеток в локальном микроокружении [100, 125].

Рецепторы, контролирующие активность NK-клеток

Наличие большого числа ингибирующих и активирующих рецепторов (табл. 3) позволяет естественным киллерам эффективно распознавать и уничтожать измененные клетки организма, например зараженные вирусами или раковые клетки. Принятие решения NK-клеткой о том, убивать мишень или нет, представляет собой процесс взвешивания «за» и «против». В том случае, если сигналы активации («за») перевесят ингибирую-

щие сигналы («против»), киллер становится цитотоксичным по отношению к мишени [78].

Первая группа рецепторов, ответственных за активность НК-клеток — это МНС-I-специфические рецепторы. Клетки организма, экспрессирующие молекулы локуса МНС-I, воспринимаются киллерами как здоровые, и, таким образом, избегают цитотоксической реакции [54, 110]. Среди МНС-I-специфических рецепторов выделяют следующие группы: Killer Ig-like receptors (KIRs), Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor (LILR, LIR, ILT, CD85) и CD94/NKG2A/B/C [78, 85, 110]. Эти рецепторы, в особенности KIR, очень полиморфны, так как их гены многократно дублированы. Эта особенность позволяет киллерам связывать молекулы разных аллелей локуса МНС I класса.

Киллерные иммуноглобулиноподобные рецепторы (KIR или CD158) НК-клеток представляют собой гликопротеины, содержащие иммуноглобулиноподобные домены [23], которые могут быть длинными (L) или короткими (S) [132]. Через KIR-рецепторы могут передаваться как сигналы ингибирования, так и активации. Лигандами KIR-рецепторов являются молекулы МНС I класса (HLA-A, HLA-B, HLA-C), а также неклассические молекулы МНС I класса [5, 38].

NKG2 рецепторы относятся к C-лектиновым рецепторам. Эти рецепторы также могут быть как активационными (NKG2C, NKG2E), так и ингибирующими (NKG2A) [59, 132]. Одним из активирующих рецепторов семейства NKG2 является NKG2D. Его лиганды — это MICA и MICB, а также UL16-связывающие белки (ULBP)1-6 [56, 78]. MICA и MICB (МНС class I-related chain molecules) — молекулы, гомологичные антигенам МНС-I [26, 37]. Как и молекулы МНС-I, они очень полиморфны: идентифицировано 100 аллельных вариантов MICA и 40 вариантов MICB [56]. При связывании лигандов с рецептором NKG2D активирующий сигнал передается в клетку за счет ассоциированной с ним адаптерной субъединицы DAP10 [56].

Лиганды NKG2D экспрессированы на многих видах опухолей и являются маркером клеток, испытывающих стресс [26, 37]. Оксидативный стресс приводит к увеличению в клетках свободных радикалов. В результате активные формы кислорода нарушают структуру ДНК, белков и липидов. Разрушение ДНК активирует сигнальные пути, в числе которых продукция лигандов рецептора NKG2D, а именно ULPBs и MICA [75]. Экспрессия лигандов NKG2D может также быть вызвана тепловым шоком, вирусной инфекцией и некоторыми провоспалительными сигналами [26]. Наличие лигандов NKG2D

на раковых клетках является сигналом к убийству для естественных киллеров. Чтобы избежать цитотоксичности НК-клеток, некоторые виды рака [26, 37, 75], а также клетки трофобласта при беременности [47], способны сбрасывать внеклеточные домены MICA/B, которые в дальнейшем связываются с рецептором NKG2D, подавляя активность естественных киллеров. Более того, показано, что продолжительное воздействие лигандов на NKG2D может вызывать нарушение других путей активации НК-клеток [26]. Что касается механизма сбрасывания лигандов, полагают, что в этом процессе задействованы матриксные металлопротеиназы (MMP929, MMP1430) и ADAM-протеазы (ADAM10, ADAM17) [26, 37]. Некоторые виды клеток также способны выделять везикулы с лигандами NKG2D. Такие лиганды являются более сильными ингибиторами, чем их срезанные протеазами фрагменты [82].

Существуют и другие рецепторы НК-клеток, лигандами которых не являются молекулы МНС. Например, рецепторы PD-1, TIGIT, TACTILE, TIM-3 и другие, отвечающие за поддержание гомеостаза НК-клеток. Эти рецепторы в норме отсутствуют на естественных киллерах. При паталогических условиях они могут быть экспрессированы, и при взаимодействии со своими лигандами на поверхности малигнизированных клеток стимулировать противоопухолевую активность НК-клеток [110].

Присутствие на НК-клетках активирующих рецепторов позволяет им распознавать лиганды на зараженных и измененных клетках и выполнять свою цитотоксическую функцию. NCR-рецепторы (от “natural cytotoxicity receptors”), принадлежащие к суперсемейству иммуноглобулинов [116] включают рецепторы NKp30, NKp44, NKp46. Лигандом для рецептора NKp46 является гемагглютинин на инфицированных клетках, для рецепторов NKp30 и NKp44 лиганды на данный момент не установлены. Предполагают, что они могут связываться с шаперонами и отдельными белками раковых клеток [38, 69].

CD16 — еще один рецептор НК-клеток, передающий активирующие сигналы. Лигандом для него является Fc-фрагмент IgG, что позволяет киллерам находить раковые клетки, покрытые антителами, и осуществлять лизис мишени механизмом, известным как ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) [78].

Помимо названных, к активирующим рецепторам относят также DNAM-1, NKp80, 2B4, NTB-A, CRACC, однако говорят об их корецепторной функции, помогающей увеличить эффект таких рецепторов, как NKG2D или группы NCR [31, 78]. Кроме того, НК-клетки могут

ТАБЛИЦА 4. ЭКСПРЕССИЯ НК-КЛЕТКАМИ РЕЦЕПТОРОВ И ЛИГАНДОВ СМЕРТИ И ДРУГИХ МОЛЕКУЛ

TABLE 4. EXPRESSION OF DEATH RECEPTORS AND LIGANDS AND OTHER MOLECULES BY NK CELLS

Молекула Molecule	Кластер дифференцировки Cluster of differentiation	Лиганды Ligands
Fas or Apo1	CD95 [85]	CD95L [85]
Fas лиганд Fas ligand	CD95L [85]	CD95 [85]
CD40L	CD154 [85]	CD40 [85]
TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)	CD253 [85]	DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) [85] TRAIL-R3/decoy receptor 1, TRAIL-R4/decoy receptor 2 (3), osteoprotegerin [112] DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) [85] TRAIL-R3/decoy receptor 1, TRAIL-R4/decoy receptor 2 (3), osteoprotegerin [112]
LAMP-1	CD107a [85]	– [85]

экспрессировать Toll-like рецепторы (TLRs), которые в присутствии провоспалительных цитокинов запускают активацию в ответ на бактериальные или вирусные продукты [8, 110].

В сигналинге большинства активирующих рецепторов важную роль играют Туг-содержащие мотивы, такие как ITAM, ITSM. Большая часть ингибирующих рецепторов содержит ITIM-мотив в составе внутриклеточных участков, который необходим при передаче в клетку ингибирующего сигнала. Существуют и другие мотивы: ITSM, ITT-like, ITIM-like [63, 78]. В отличие от ингибирующих рецепторов, несущих такие последовательности в цитозольном домене большинство активирующих рецепторов взаимодействует с мотив-содержащими молекулами. Так, сигнал от рецептора NKp44 и активирующих KIR передается от ассоциированного с ними гомодимера адаптерного белка DAP12, каждый мономер которого обладает последовательностью ITAM [54]. Сигналы от рецепторов NKp30, NKp46 и CD16 поступают в клетку за счет сигнальных молекул CD3 ζ и Fc ϵ RI γ , имеющих ITAM-мотивы [58, 96, 114]. Комплекс CD3 принято считать маркером Т-лимфоцитов. Он ассоциирован с Т-клеточным рецептором (TCR) и необходим для его функционирования. Установлено, что комплекс CD3 состоит из трех димеров: CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$ и CD3 $\zeta\zeta$ [70]. Молекула CD3 ζ помимо Т-лимфоцитов была найдена у NKT- и у НК-клеток [57, 87, 114]. Показано, что низкий уровень CD3 ζ влияет на активность НК-клеток, а именно на процесс ADCC, в котором задействован рецептор CD16 [114].

НК-клетки очень разнообразны благодаря комбинации активирующих и ингибирующих рецепторов. В связи с этим могут формироваться естественные киллеры с малым количеством ингибирующих рецепторов, или такие, у которых активирующие рецепторы связываются с молекулами МНС-I [42]. В таких случаях киллеры могут воспринимать в качестве своих мишеней здоровые клетки. Чтобы избежать этого, существует обучение, пройдя которое НК-клетки приобретают способность отличать здоровые клетки от дефектных [35, 42, 118]. Клетки, проходящие обучение, в последствии отличаются по уровню восприимчивости к своим мишеням. Были предложены две модели, объясняющие эти различия [42]. Первая модель, модель «вооружения», предполагает, что восприимчивость НК-клеток тем выше, чем больше лигандов они связали ингибирующими рецепторами в ходе развития. Киллеры, несущие малое количество ингибирующих рецепторов или киллеры, не встретившие подходящий лиганд во время созревания, не способны в полной мере выполнять свои функции в будущем и становятся гипореактивными. Таким образом, вовлечение ингибирующих рецепторов НК-клетками во время развития делает их более компетентными [35, 42].

Вторая модель, модель «разоружения», заключается в потере клетками чувствительности при отсутствии стимуляции их ингибирующих рецепторов. Дело в том, что и зрелые и незрелые НК-клетки постоянно подвержены стимуляциям со стороны окружающих клеток. В случае если НК-клетки постоянно активируются, но практически не получают ингибирующие сигналы, они

теряют восприимчивость [42]. Было показано, что гипореактивные NK-клетки способны повышать свою активность при переносе из организма с недостаточным уровнем молекул МНС-I в организм с нормальными показателями МНС-I. Это свидетельствует об их способности обучаться в зрелом состоянии [35].

Существуют также другие молекулы, свойственные NK-клеткам (табл. 4). Как уже отмечено выше, воздействие на NK-клетку через рецептор Fas (CD95) приводит к ее гибели путем апоптоза. Напротив, Fas-лиганд, а также TRAIL и CD40L используется киллерами для убийства своих мишеней [85]. Молекула LAMP-1 (CD107 α) — это маркер дегрануляции, позволяющий определить активность NK-клеток относительно мишеней [85].

Таким образом, несмотря на отсутствие у естественных киллеров реаранжировки рецепторных генов, как это происходит у Т- и В-лимфоцитов, они также подразделяются на популяции, обладающие разным фенотипом. Наличие хемокиновых рецепторов позволяет NK-клеткам мигрировать к месту воспаления, ингибирующие и активирующие рецепторы помогают с большой точностью узнавать малигнизированные клетки, а адгезионные молекулы — прикрепляться к ним для последующего убийства.

Функции NK-клеток и механизмы их реализации

Функции естественных киллеров заключаются в обнаружении и уничтожении трансформированных клеток. Часто это клетки, утратившие молекулы МНС-I на мембране: инфицированные вирусами и опухолевые. Находясь в поиске мишеней, NK-клетки пользуются своими рецепторами, которые связываются с соответствующими лигандами. Эти взаимодействия считаются начальным этапом формирования иммунологического синапса, который способен запустить процесс выделения киллером везикул, содержащих литические молекулы [78].

Формирование активирующего иммунологического синапса

Иммунологический синапс (ИС) — контакт, образующийся между клеткой иммунной системы и клеткой-мишенью. С его помощью естественный киллер осуществляет направленную секрецию своих гранул, не затрагивая соседние клетки и не повреждая их [12]. В зависимости от решения киллера о том, как поступить с клеткой-мишенью, между ними формируются разные контакты. В том случае, если на клетке оказалось мало молекул МНС-I или она экспрессирует несвойственные здоровой клетке белки, связавшиеся с активирующими рецепторами на

NK-клетке, происходит формирование активирующего синапса. Клетка, признанная киллером здоровой, проходит через образование ингибирующего синапса и остается нетронутой [34].

Иммунологический синапс представляет собой скопление молекул в NK-клетке на границе с клеткой-мишенью. Такими молекулами могут быть рецепторы, элементы цитоскелета, сигнальные молекулы и клеточные органеллы [92]. Локальные скопления этих молекул в пределах синапса называют надмолекулярным кластером активации (SMAC), который делится на периферическую (pSMAC) и центральную (cSMAC) зоны [92]. В центральной зоне был обнаружен перфорин и некоторые активирующие рецепторы, в периферической — молекулы адгезии (CD2, CD11 α , CD11b), F-актин и часть активирующих рецепторов (NKG2D) [34, 93].

Процесс контакта NK-клетки с мишенью можно представить в трех этапах. Первый этап — узнавание, которое заключается в контакте и адгезии с клеткой-мишенью, а также в принятии решения о ее судьбе. Второй этап — эффекторный: реорганизация цитоскелета киллера, в том числе полимеризация актина и рост микротрубочек, кластеризация рецепторов и амплификация сигналов, синтез необходимых литических молекул, их транспорт к мембране и высвобождение в синапс. Последний этап — терминация, в ходе которой NK-клетка высвобождается из контакта с клеткой и готовится реагировать на новые мишени [67].

Изначально NK-клетка находится в поиске своих мишеней, взаимодействуя с множеством окружающих ее клеток. Она может передвигаться по градиенту хемокинов и прибывать в места, где необходимы эффекторные функции NK-клеток [92]. Первые слабые контакты киллера с мишенью осуществляются с помощью «связывающих» рецепторов, например CD62L [67]. Последующая адгезия осуществляется благодаря взаимодействию CD2, DNAM-1, NKG2D, NCR и молекул LFA-1 [67]. Сигналы от активирующих рецепторов и адгезионных молекул вызывают ответ в NK-клетке, в результате чего полимеризующийся F-актин, LFA-1, MAC-1, киндлин-3 и талин-1 формируют кольцо pSMAC [53, 55]. Одновременно с этим происходит кластеризация рецепторов, связавшихся с лигандами на мишени, в зоне cSMAC [34]. Исключением является рецептор NKG2D, который образует кластеры, собранные в кольцо, окружающее центральную зону [55]. В формировании синапса также важную роль играет организация цитоскелета клетки-мишени: заякоривание молекул ICAM-1 белками цитоскелета позволяет NK-клеткам эф-

фективнее связываться с мишенью [55]. В ответ на активирующие сигналы к области синапса рекрутируются молекулы-участники сигнальных путей (Src, ZAP70, Syk, Vav-1, SHP-1 и др.) и формируют сигналосому, что приводит к быстрой передаче и амплификации сигнала, ведущего к цитотоксичности и секреции цитокинов НК-клеткой [53].

Роль цитоскелета в формировании иммунологического синапса

В организации ИС, а также в процессе выделения литических гранул и поляризации клетки большое значение имеет цитоскелет. В частности, без полимеризованного F-актина в области синапса невозможна нормальная цитотоксичность НК-клеток [73, 94]. В полимеризации актина принимает участие интегрин LFA-1 и белок таллин, а в его ветвлении и накоплении в области синапса — белок синдрома Вискотта—Олдрича (WASp) [55]. У людей с мутацией по белку WAS F-актин в иммунологическом синапсе не накапливается, в результате чего НК-клетки работают неэффективно [94]. Помимо актина, для цитотоксической реакции НК-клеток необходимо участие ЦОМТ (центр организации микротрубочек). При помощи микротрубочек, а также F-актина, литические гранулы транспортируются по направлению к синапсу. Было показано, что, в ответ на активацию, везикулы с перфорином и гранзимами движутся по микротрубочкам при помощи белка динеина по направлению к ЦОМТ, после чего этот комплекс направляется к ИС [55]. Полагают, что поляризация ЦОМТ обеспечивается актиновыми филаментами и связанными с ними белками cdc42, CIP4, WASp, IQGAP1 [12, 55]. Предполагается, что CIP4 может быть белком, обеспечивающим связь между тубулином и актином через белок WAS, а также способен удерживать ЦОМТ в районе SMAC, тем самым регулируя направленную доставку литических гранул [12].

Секреция литических гранул НК-клеток

Направляясь к мембране, везикулы взаимодействуют с плотной сетью F-актина, а немышечный миозин II способствует продвижению гранул [97]. Полагают, что комплекс белков Rab27 и Munc13-4 участвует в процессе дегрануляции, «привязывая» литические гранулы к плазматической мембране [36]. Возможно, именно белок Munc13-4 является сенсором Ca^{2+} , который необходим для слияния везикул с мембраной [19]. Уровень Ca^{2+} в клетке повышается при активации НК-клетки, это происходит за счет его выхода из кальциевых депо, а также притока из внеклеточного пространства через мембрану. В частности, фосфолипаза $C\alpha$, активированная протеинкина-

зой Syk, запускает каскад, приводящий к увеличению концентрации кальция: она гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP2) мембраны до диацилглицерола (DG) и инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3), после чего последний связывается с кальциевым каналом эндоплазматического ретикулума (ЭПР), что приводит к выходу Ca^{2+} в цитоплазму. Истощение Ca^{2+} в ЭПР вызывает активацию стромальной молекулы взаимодействия 1 (STIM1), и она открывает мембранный Ca^{2+} канал ORAI1, обеспечивающий вход внеклеточного кальция — процесс, названный SOCE (store-operated Ca^{2+} entry) [97].

Повышение уровня внутриклеточного кальция необходимо для праймирования — процесса подготовки везикулы к слиянию с клеточной мембраной. Праймирование включает в себя сборку комплексов, содержащих SNARE-белки, ответственные за слияние двух мембран: v-SNARE комплекс на везикулах и t-SNARE — на плазматической мембране мишени [97]. У НК-клеток идентифицированы несколько основных белков группы v-SNARE, участвующих в литической функции: синтаксин-7, SNAP23, VAMP4 и VAMP7 [92, 97]. В процессе их взаимодействия литические гранулы сливаются с мембраной НК-клетки, высвобождая свой секрет в синаптическую щель [97]. Белки, входящие в состав гранул, — перфорин и гранзим — выполняют следующие функции: первый образует поры в цитоплазматической мембране клетки-мишени, а второй проникает через поры и запускает апоптоз через каспаза-зависимый или -независимый путь [53]. Чтобы избежать воздействия собственных литических молекул, НК-клетки экспрессируют на своей поверхности LAMP-1 и катепсин В [11, 67].

Экзоцитоз литических гранул может проходить двумя способами: везикулы могут сливаться с мембраной полностью, высвобождая все свое содержимое, либо сливаться частично, удерживая большую часть гранул в НК-клетках. Предполагается, что удержание гранул может быть связано с другими механизмами экзоцитоза, которые свойственны другим секреторирующим клеткам, например нейронам [67]. Кроме того, постепенное расходование гранул позволяет естественным киллерам осуществлять серийный киллинг — способность атаковать новую пораженную клетку, не восстанавливая запасы литических гранул [28, 67, 88]. После осуществления цитотоксической функции НК-клетка какое-то время остается прикрепленной к мишени, после чего отсоединяется от нее, и синапс разрушается [53, 88].

Все же в настоящее время нельзя считать решенным до конца вопрос о способе доставки гранзима в цитоплазму клетки-мишени. Помимо классической и считающейся доказанной теории цитолиза клетки при помощи перфорины, образующего пору в цитоплазматической мембране и проникновения через нее в цитоплазму гранзима [65, 126], ранее существовала и другая теория: эндосома с перфорином и гранзимом эндоцитируются клеткой и уже в мембране эндосомы перфорин образует пору, через которую гранзим проникает в цитоплазму и запускает апоптоз [49, 77, 107]. О процессе терминации известно не много, однако есть факторы, которые могут влиять на открепление киллера от мишени. Полагают, что наличие поблизости других «больных» клеток стимулирует естественные киллеры быстрее покинуть предыдущую клетку и атаковать новую. Кроме того, в киллере происходит интеграция активирующих сигналов от старой и новой мишеней, поэтому скорость киллинга новой мишени растет [88].

Естественные киллеры обладают дополнительными структурами, которые помогают им осуществлять свои функции — это мембранные нанотрубки. Они формируются сразу после контакта НК-клетки с мишенью и помогают при начальных взаимодействиях [67]. Кроме того, когда ИС между киллером и атакуемой клеткой разрушается, нанотрубки способны сохранять связь между ними даже на больших расстояниях [55]. Предполагают, что нанотрубки усиливают цитотоксичность киллеров и даже способны доставлять литические гранулы к мишени [67]. Другой пример взаимодействия НК-клеток с клетками-мишенями — образование экзосом (везикул диаметром 50-100 нм), содержащих поверхностные маркеры киллера, перфорин, FasL и ключевые лиганды, обеспечивающие надежное взаимодействие клеток. После высвобождения из НК-клеток такие экзосомы могут опосредовать гибель клетки-мишени вне зависимости от образования ИС [67]. Недавно обнаружен дополнительный способ доставки перфорины и гранзима в клетку мишень при помощи микровезикул — везикул диаметром 150-1000 нм, образующиеся клетками путем блеббинга цитоплазматической мембраны [111].

Киллинг, осуществляемый с помощью формирования активирующего ИС и выделения литических гранул, очень эффективен. Есть данные о том, что одновременно НК-клетка способна контактировать с двумя или более клетками. Кроме того, киллер может продолжать атаковать мишени до полного истощения везикул, что соответствует 4 клеткам и более [18].

Рецептор-опосредованные механизмы индукции НК-клетками цитотоксичности

Кроме секреции литических гранул, существуют и другие способы убийства НК-клетками, например выделение цитокинов TNF α и IFN γ , использование Fas-лиганда (FasL) и TRAIL, которые вызывают рецептор-опосредованный апоптоз, а также антителозависимая клеточная цитотоксичность [78].

IFN γ и TNF α могут вызывать гибель опухолевых клеток, стимулируя в них экспрессию молекул ICAM-1, вследствие чего они становятся более чувствительными к лизису НК-клетками [127]. Кроме того, IFN γ и TNF α вызывают апоптоз опухолевых клеток. При связывании TNF α со своим рецептором на клетке-мишени, в ней запускается сигнальный каскад, итогом которого является активация прокаспазы-8 и запуск каскада протеаз, ведущий к апоптозу [124]. В случае IFN γ гибель некоторых опухолевых клеток запускается через сигнальный путь Stat1. В результате каскада реакций происходит активация экспрессии генов, кодирующих внутриклеточные или мембранные компоненты, которые способствуют клеточному апоптозу, такие как каспаза-1 или Fas и FasL [50].

Молекулы FasL и TRAIL представляют собой трансмембранные белки и входят в семейство фактора некроза опухоли (TNF) [112]. Они способны вызывать апоптоз клеток, несущих лиганды для этих рецепторов. При тримеризации FasL связывает рецептор Fas, далее рецептор рекрутирует Fas-ассоциированный домен смерти (FADD) и прокаспазу-8, формируя сигнальный комплекс, индуцирующий смерть (DISC) [7, 39]. После этого активируются каспазы 8 и 10, запускается каспазный каскад, что в последствии приводит к клеточной гибели [99]. Похожий механизм передачи сигнала наблюдается при связывании TRAIL с рецепторами TRAIL-R1 и TRAIL-R2. Показано, что цитотоксичность, опосредованная TRAIL, важна для контроля НК-клетками вирусных инфекций и рака [99].

Антителозависимая цитотоксичность — механизм активации иммунных клеток в результате взаимодействия их CD16 с Fc-фрагментом антител, связавшихся с антигеном на поверхности мишени. Активируясь, НК-клетки выделяют перфорин, гранзимы и цитокины, например, IFN γ , что приводит к лизису клеток-мишеней [123].

Формирование ингибирующего иммунологического синапса

Помимо активирующих иммунологических синапсов выделяют ингибирующие. Рецепторы НК-клеток могут связывать молекулы MHC-I (а именно HLA-C) и точно так же собираться в кластеры, формируя синапс. Чем выше уровень экс-

прессии молекул HLA-C клеткой-мишенью, тем больше рецепторов KIR киллера с ними связывается и тем сильнее ингибирующий эффект [54]. Связавшиеся рецепторы KIR быстро собираются в центре ИС вместе с SHP-1, после чего окружаются молекулами LFA-1. Однако было показано, что связывание большого числа KIR с HLA-C предотвращает накопление LFA-1, поэтому в сравнении с активирующим, у ингибирующего ИС этот интегрин представлен в меньшей степени [109]. В отличие от активирующего, при формировании ингибирующего ИС не требуется энергия АТФ и реорганизация актина, но необходим Zn^{2+} [54, 88]. Таким образом, ингибирующий иммунологический синапс сильно отличается от активирующего.

Примером регуляции активности NK-клеток через создание ингибирующего синапса ИС является их взаимодействие с трофобластом в зоне маточно-плацентарного контакта. Клетки трофобласта практически не экспрессируют классические молекулы HLA. На их поверхности найдены некоторые молекулы HLA-C и неклассические HLA-E, HLA-F и HLA-G [44, 83, 98]. Неклассическая молекула HLA-E присутствует на вневорсинчатом трофобласте в промежутке от 5-й до 7-й недели, что говорит о ее роли в процессе плацентации и раннего развития плаценты. Она связывается с рецептором CD94/NKG2 на uNK-клетках, что вызывает сильный ингибирующий сигнал, подавляющий большинство активирующих [98]. Молекулы локуса HLA-G взаимодействуют с рецепторами KIR2DL4 и LILRB1, в результате чего цитотоксичность uNK-клеток против трофобласта также ослабляется [10, 44]. Полагают, что вклад молекулы HLA-G в снижение цитотоксичности uNK-клеток незначителен, но ее связывание с рецептором KIR2DL4 способствует усилению синтеза в uNK-клетках некоторых цитокинов, таких как $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6 и IL-8, вследствие чего ремоделирование сосудов происходит успешнее [101]. Некоторые цитокины, выделяемые естественными киллерами: $IFN\gamma$, GM-CSF, IL-10, LIF, усиливают экспрессию HLA-G на опухолевых клетках [113]. Молекулы HLA-C полиморфны и являются основными лигандами для рецепторов KIR. Ингибирующий сигнал, следующий за связыванием HLA-C с KIR, тормозит процесс дегрануляции в NK и уменьшает у них секрецию факторов, регулирующих вневорсинчатый трофобласт: IL-8, VEGF, PGF, CXCL10 [98]. При связывании HLA-C с рецепторами KIR2DS1 и KIR2DS4 в NK-клетках генерируется активирующий сигнал, что ведет к синтезу и выделению GM-CSF и TNF [98]. В зависимости от комбинации HLA-C/

KIR плацентация проходит успешно либо наблюдается преэклампсия [48]. Таким образом, экспрессия трофобластом преимущественно неклассических молекул HLA подавляет цитотоксичность NK-клеток.

Секреция NK-клетками цитокинов

Помимо основной функции, связанной с уничтожением клеток, естественные киллеры являются источником цитокинов [6]. После взаимодействия NK-клеток с мишенью и при действии на них некоторых интерлейкинов они продуцируют $IFN\gamma$, который повышает уровень экспрессии MHC-I, способствует дифференцировке Т-хелперов, а также обладает противовирусными, противоопухолевыми и иммунорегуляторными свойствами. $TNF\alpha$ также синтезируется в киллерах после контакта с мишенью и запускает каскады провоспалительных цитокинов в зоне воспалительной реакции [27]. Также киллеры выполняют регуляторную функцию, модулируя работу дендритных клеток, моноцитов, макрофагов и лимфоцитов путем выделения цитокинов либо прямым клеточным контактом [6].

Наряду с функциями, которые свойственны клеткам врожденного иммунитета, NK-клетки также демонстрируют эффекторные реакции, свойственные клеткам адаптивного иммунитета. Были проведены исследования, которые показали, что в организме мышей, лишенных В- и Т-лимфоцитов, происходит реакция гиперчувствительности в ответ на гаптены. Ответ возникал на гаптены, которыми мыши были предварительно иммунизированы, а также сохранялся в течение четырех недель. В то же время у мышей, лишенных В- и Т-лимфоцитов и NK-клеток реакции гиперчувствительности не возникало. После переноса таким мышам NK-клеток от предварительно сенсibilизированных мышей-доноров, вновь наблюдалась реакция гиперчувствительности, что говорит о наличии у естественных киллеров механизма сохранения сенсibilизированного состояния [91]. Описана способность NK-клеток, предварительно активированных цитокинами IL-12 и IL-18, через определенный промежуток времени (от 7 дней до 21 дня) при повторной стимуляции цитокинами продуцировать повышенное по сравнению с контролем количество $IFN\gamma$ [106]. Ранее мы рассматривали подобное свойство NK-клеток [81]. Способность NK-клеток сохранять сенсibilизированное состояние важна для беременности. Децидуальные NK-клетки дают начало особой популяции киллеров, которые при повторной беременности выделяют больше молекул $IFN\gamma$ и VEGF, что может способствовать более успешной плацентации [83, 95]. Тем не менее вопрос нали-

чия у NK-клеток памяти малоизучен и нуждается в дополнительных исследованиях.

Заключение

Таким образом, NK-клетки образуются в костном мозге из гемопоэтических стволовых клеток, последовательно проходя стадии CLP, общего предшественника ILC, предшественника NK-клеток, незрелых NK-клеток, формируя пул зрелых NK-клеток. Выделяют две функционально различные популяции NK-клеток CD56^{bright}CD16⁻ и CD56^{dim}CD16⁺. NK-клетки экспрессируют широкий спектр адгезионных молекул (LFA-1, LFA-2, LFA-3; α M β 2, α X β 2, L-selectin, VLA-4, VLA-5; PECAM-1 и другие). Цитокиновое и хемокин-ное микроокружение оказывает влияние на NK-клетки, что определяется разнообразием экспрессируемых NK-клетками цитокиновых рецепторов (IL-1R, IL-2ra, IL-2Rb/IL-2Rc, IL-6R α , IL-7ra, IL-8R, IL-10R, IL-12R β 1, IL-15ra, IL-18R, IL-21ra, IFNGR2, TGFBR, c-Kit, CXCR1, CXCR3, CXCR4, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, IChemR23, CX3CR1). NK-клетки реализуют цитотоксическую активность за счет экспрессии разных групп рецепторов, в том числе МНС-I-специфических рецепторов KIR и NKG2, рецепторов NCR, Fc-рецепторов CD16, взаимодействия рецепторов и лигандов смерти (Fas-FasL и TRAIL-TRAILR), а также рецепторов DNAM-1, NKp80, TLR. Реализация цитотоксической функции NK-клеток включает формирование иммунологического синапса между клеткой иммунной системы и

клеткой-мишенью. В состав иммунологического синапса входят разнообразные рецепторы, элементы цитоскелета, сигнальные молекулы и клеточные органеллы, что определяет продвижение литических гранул внутри цитоплазмы к плазматической мембране и в итоге эффективность секреции литических гранул и индукцию гибели клетки-мишени. Экзоцитоз литических гранул может проходить двумя способами: везикулы могут сливаться с мембраной полностью, высвобождая все свое содержимое, либо сливаться частично, удерживая большую часть гранул в NK-клетках. Частичный выброс содержимого гранул обеспечивает постепенное расходование гранул и растянутую во времени цитотоксическую активность. NK-клетки могут взаимодействовать с дефектными клетками с помощью образования экзосом (везикул диаметром 50-100 нм), содержащих перфорин и FasL. Также NK-клетки могут индуцировать гибель клеток-мишеней за счет микровезикул – везикул диаметром 150-1000 нм, образующиеся клетками путем блеббинга цитоплазматической мембраны и содержащих гранзим В. NK-клетки способны секретировать цитокины, а под действием некоторых стимулов сохранять активированное состояние в течение продолжительного времени. В целом способность NK-клеток отличать здоровые клетки от дефектных по принципу «отсутствия своего» дополняет работу лимфоцитов, что делает функционирование иммунной системы более эффективным.

Список литературы / References

1. Коваленко Е.И., Стрельцова М.А. Адаптивные свойства натуральных киллеров – лимфоцитов врожденного иммунитета // Биоорганическая химия, 2016. Т. 42, № 6. С. 649-667. [Kovalenko E.I., Streltsova M.A. Adaptive features of natural killer cells, lymphocytes of innate immunity. *Bioorganicheskaya khimiya = Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2016, Vol. 42, no. 6, pp. 649-667. (In Russ.)]
2. Михайлова В.А. Лимфоциты врожденного иммунитета эндометрия и децидуальной оболочки человека // Иммунология, 2019. Т. 40, № 3. С. 83-92. [Mikhailova V.A. Innate lymphoid cells of human endometrium and decidua. *Immunologiya = Immunologiya*, 2019, Vol. 40, no. 3, pp. 83-92. (In Russ.)]
3. Михайлова В.А., Онохина Я.С., Сельков С.А., Соколов Д.И. Экспрессия адгезионных молекул и хемокиновых рецепторов NK-клетками периферической крови при беременности // Иммунология, 2011. Т. 32, № 2. С. 78-81. [Mikhailova V.A., Onokhina Ya.S., Selkov S.A., Sokolov D.I. Expression of adhesion molecules and chemokine receptors by peripheral blood NK-cells in pregnancy. *Immunologiya = Immunologiya*, 2011, Vol. 32, no. 2, pp. 78-81. (In Russ.)]
4. Михайлова В.А., Сельков С.А., Соколов Д.И. Фенотипические и функциональные характеристики NK-клеток при беременности // Акушерство и гинекология, 2011. № 5. С. 4-9. [Mikhailova V.A., Selkov S.A., Sokolov D.I. Phenotypic and functional characteristics of NK cells in pregnancy. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2011, no. 5, pp. 4-9. (In Russ.)]
5. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2011. 752 p.
6. Abel A.M., Yang C., Thakar M.S., Malarkannan S. Natural killer cells: development, maturation, and clinical utilization. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869.
7. Abrahams V.M., Straszewski-Chavez S.L., Guller S., Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol. Hum. Reprod.*, 2004, Vol. 10, no. 1, pp. 55-63.

8. Adib-Conquy M., Scott-Algara D., Cavaillon J.M., Souza-Fonseca-Guimaraes F. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunol. Cell Biol.*, 2014, Vol. 92, no. 3, pp. 256-262.
9. Allan D.S., Rybalov B., Awong G., Zuniga-Pflucker J.C., Kopcow H.D., Carlyle J.R., Strominger J.L. TGF-beta affects development and differentiation of human natural killer cell subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, no. 8, pp. 2289-2295.
10. Ander S.E., Diamond M.S., Coyne C.B. Immune responses at the maternal-fetal interface. *Sci. Immunol.*, 2019, Vol. 4, no. 31, eaat6114. doi: 10.1126/sciimmunol.aat6114.
11. Balaji K.N., Schaschke N., Machleidt W., Catalfamo M., Henkart P.A. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 196, no. 4, pp. 493-503.
12. Banerjee P.P., Pandey R., Zheng R., Suhoski M.M., Monaco-Shawver L., Orange J.S. Cdc42-interacting protein-4 functionally links actin and microtubule networks at the cytolytic NK cell immunological synapse. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 10, pp. 2305-2320.
13. Barber D.F., Faure M., Long E.O. LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 6, pp. 3653-3659.
14. Bender A.T., Tzvetkov E., Pereira A., Wu Y., Kasar S., Przetak M.M., Vlach J., Niewold T.B., Jensen M.A., Okitsu S.L. TLR7 and TLR8 differentially activate the IRF and NF-kappaB pathways in specific cell types to promote inflammation. *Immunohorizons*, 2020, Vol. 4, no. 2, pp. 93-107.
15. Berahovich R.D., Lai N.L., Wei Z., Lanier L.L., Schall T.J. Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 11, pp. 7833-7840.
16. Bernardini G., Gismondi A., Santoni A. Chemokines and NK cells: regulators of development, trafficking and functions. *Immunol. Lett.*, 2012, Vol. 145, no. 1-2, pp. 39-46.
17. Bernstone L., van Wilgenburg B., James W. Several commercially available anti-CCR5 monoclonal antibodies lack specificity and should be used with caution. *Hybridoma (Larchmt)*, 2012, Vol. 31, no. 1, pp. 7-19.
18. Bhat R., Watzl C. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells – enhancement by therapeutic antibodies. *PLoS One*, 2007, Vol. 2, no. 3, e326. doi: 10.1371/journal.pone.0000326.
19. Bin N.R., Ma K., Tien C.W., Wang S., Zhu D., Park S., Turlova E., Sugita K., Shirakawa R., van der Sluijs P., Horiuchi H., Sun H.S., Monnier P.P., Gaisano H.Y., Sugita S. C2 Domains of Munc13-4 Are Crucial for Ca(2+)-dependent degranulation and cytotoxicity in NK cells. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 201, no. 2, pp. 700-713.
20. Bonanni V., Sciume G., Santoni A., Bernardini G. Bone marrow NK cells: origin, distinctive features, and requirements for tissue localization. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1569. doi: 10.3389/fimmu.2019.01569.
21. Bozzano F., Perrone C., Moretta L., de Maria A. NK cell precursors in human bone marrow in health and inflammation. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2045. doi: 10.3389/fimmu.2019.02045.
22. Bulla R., Villa A., Bossi F., Cassetti A., Radillo O., Spessotto P., de Seta F., Guaschino S., Tedesco F. VE-cadherin is a critical molecule for trophoblast-endothelial cell interaction in decidual spiral arteries. *Exp. Cell Res.*, 2005, Vol. 303, no. 1, pp. 101-113.
23. Campbell K.S., Purdy A.K. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*, 2011, Vol. 132, no. 3, pp. 315-325.
24. Carman C.V., Springer T.A. A trans migratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.*, 2004, Vol. 167, no. 2, pp. 377-388.
25. Cartwright J.E., Balarajah G. Trophoblast interactions with endothelial cells are increased by interleukin-1beta and tumour necrosis factor alpha and involve vascular cell adhesion molecule-1 and alpha4beta1. *Exp. Cell Res.*, 2005, Vol. 304, no. 1, pp. 328-336.
26. Chitadze G., Lettau M., Bhat J., Wesch D., Steinle A., Furst D., Mytilineos J., Kalthoff H., Janssen O., Oberg H.H., Kabelitz D. Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the “a disintegrin and metalloproteases” 10 and 17. *Int. J. Cancer*, 2013, Vol. 133, no. 7, pp. 1557-1566.
27. Cichocki F., Schlums H., Theorell J., Tesi B., Miller J.S., Ljunggren H.G., Bryceson Y.T. Diversification and functional specialization of human NK cell subsets. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2016, Vol. 395, pp. 63-94.
28. Cohnen A., Chiang S.C., Stojanovic A., Schmidt H., Claus M., Saftig P., Janssen O., Cerwenka A., Bryceson Y.T., Watzl C. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood*, 2013, Vol. 122, no. 8, pp. 1411-1418.
29. Cooper M.A., Fehniger T.A., Turner S.C., Chen K.S., Ghaheri B.A., Ghayur T., Carson W.E., Caligiuri M.A. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 10, pp. 3146-3151.
30. Cui G., Hara T., Simmons S., Wagatsuma K., Abe A., Miyachi H., Kitano S., Ishii M., Tani-ichi S., Ikuta K. Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, no. 5, pp. 1915-1920.
31. Del Zotto G., Marcenaro E., Vacca P., Sivori S., Pende D., Della Chiesa M., Moretta F., Ingegnere T., Mingari M.C., Moretta A., Moretta L. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2017, Vol. 92, no. 2, pp. 100-114.

32. Diefenbach A., Colonna M., Romagnani C. The ILC World Revisited. *Immunity*, 2017, Vol. 46, no. 3, pp. 327-332.
33. Dunne J.L., Collins R.G., Beaudet A.L., Ballantyne C.M., Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 11, pp. 6105-6111.
34. Dustin M.L., Long E.O. Cytotoxic immunological synapses. *Immunol. Rev.*, 2010, Vol. 235, no. 1, pp. 24-34.
35. Elliott J.M., Wahle J.A., Yokoyama W.M. MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *J. Exp. Med.*, 2010, Vol. 207, no. 10, pp. 2073-2079.
36. Elstak E.D., Neeft M., Nehme N.T., Callebaut I., de Saint Basile G., van der Sluijs P. Munc13-4*rab27 complex tethers secretory lysosomes at the plasma membrane. *Commun. Integr. Biol.*, 2012, Vol. 5, no. 1, pp. 64-67.
37. Ferrari de Andrade L., Tay R.E., Pan D., Luoma A.M., Ito Y., Badrinath S., Tsoucas D., Franz B., May K.F., Jr., Harvey C.J., Kobold S., Pyrdol J.W., Yoon C., Yuan G.C., Hodi F.S., Dranoff G., Wucherpennig K.W. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science*, 2018, Vol. 359, no. 6383, pp. 1537-1542.
38. Foley B., Felices M., Cichocki F., Cooley S., Verneris M.R., Miller J.S. The biology of NK cells and their receptors affects clinical outcomes after hematopoietic cell transplantation (HCT). *Immunol. Rev.*, 2014, Vol. 258, no. 1, pp. 45-63.
39. Frangsmyr L., Baranov V., Nagaeva O., Stendahl U., Kjellberg L., Mincheva-Nilsson L. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol. Hum. Reprod.*, 2005, Vol. 11, no. 1, pp. 35-41.
40. Freud A.G., Yu J., Caligiuri M.A. Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Semin. Immunol.*, 2014, Vol. 26, no. 2, pp. 132-137.
41. Frumento G., Rotondo R., Tonetti M., Damonte G., Benatti U., Ferrara G.B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 196, no. 4, pp. 459-468.
42. Frutoso M., Mortier E. NK Cell Hyporesponsiveness: more is not always better. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 18, 4514. doi: 10.3390/ijms20184514.
43. Fu B., Zhou Y., Ni X., Tong X., Xu X., Dong Z., Sun R., Tian Z., Wei H. Natural Killer Cells Promote Fetal Development through the Secretion of Growth-Promoting Factors. *Immunity*, 2017, Vol. 47, no. 6, pp. 1100-1113.e6.
44. Furuya M., Kurasawa K., Nagahama K., Kawachi K., Nozawa A., Takahashi T., Aoki I. Disrupted balance of angiogenic and antiangiogenic signalings in preeclampsia. *J. Pregnancy*, 2011, Vol. 2011, 123717. doi: 10.1155/2011/123717.
45. Gismondi A., Morrone S., Humphries M.J., Piccoli M., Frati L., Santoni A. Human natural killer cells express VLA-4 and VLA-5, which mediate their adhesion to fibronectin. *J. Immunol.*, 1991, Vol. 146, no. 1, pp. 384-392.
46. Gotthardt D., Trifinopoulos J., Sexl V., Putz E.M. JAK/STAT cytokine signaling at the crossroad of NK cell development and maturation. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2590. doi: 10.3389/fimmu.2019.02590.
47. Hedlund M., Stenqvist A.C., Nagaeva O., Kjellberg L., Wulff M., Baranov V., Mincheva-Nilsson L. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 1, pp. 340-351.
48. Hiby S.E., Apps R., Sharkey A.M., Farrell L.E., Gardner L., Mulder A., Claas F.H., Walker J.J., Redman C.W., Morgan L., Tower C., Regan L., Moore G.E., Carrington M., Moffett A. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J. Clin. Invest.*, 2010, Vol. 120, no. 11, pp. 4102-4110.
49. Hiebert P.R., Granville D.J. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol. Med.*, 2012, Vol. 18, no. 12, pp. 732-41.
50. Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, Vol. 13, no. 2, pp. 95-109.
51. Kang X., Kim J., Deng M., John S., Chen H., Wu G., Phan H., Zhang C.C. Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell Cycle*, 2016, Vol. 15, no. 1, pp. 25-40.
52. Konjevic G.M., Vuletic A.M., Mirjagic Martinovic K.M., Larsen A.K., Jurisic V.B. The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment. *Cytokine*, 2019, Vol. 117, pp. 30-40.
53. Krzewski K., Strominger J.L. The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2008, Vol. 20, no. 5, pp. 597-605.
54. Kumar S. Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology*, 2018, Vol. 154, no. 3, pp. 383-393.
55. Lagrue K., Carisey A., Oszmiana A., Kennedy P.R., Williamson D.J., Cartwright A., Barthen C., Davis D.M. The central role of the cytoskeleton in mechanisms and functions of the NK cell immune synapse. *Immunol. Rev.*, 2013, Vol. 256, no. 1, pp. 203-221.
56. Lanier L.L. NKG2D Receptor and its ligands in host defense. *Cancer Immunol. Res.*, 2015, Vol. 3, no. 6, pp. 575-582.

57. Lanier L.L., Yu G., Phillips J.H. Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *J. Immunol.*, 1991, Vol. 146, no. 5, pp. 1571-1576.
58. Lanier L.L., Yu G., Phillips J.H. Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature*, 1989, Vol. 342, no. 6251, pp. 803-805.
59. Lazetic S., Chang C., Houchins J.P., Lanier L.L., Phillips J.H. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J. Immunol.*, 1996, Vol. 157, no. 11, pp. 4741-4745.
60. Lee C.C., Avalos A.M., Ploegh H.L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 3, pp. 168-179.
61. Li Z., Deng M., Huang F., Jin C., Sun S., Chen H., Liu X., He L., Sadek A.H., Zhang C.C. LILRB4 ITIMs mediate the T cell suppression and infiltration of acute myeloid leukemia cells. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 3, pp. 272-282.
62. Linhares-Lacerda L., Ribeiro-Alves M., Nogueira A.C., Mendes-da-Cruz D.A., Magalhaes D.A., Dardenne M., Passos G.A., Savino W. RNA interference-mediated knockdown of CD49e (alpha5 integrin chain) in human thymic epithelial cells modulates the expression of multiple genes and decreases thymocyte adhesion. *BMC Genomics*, 2010, Vol. 11, Suppl. 5, S2. doi: 10.1186/1471-2164-11-S5-S2.
63. Liu S., Zhang H., Li M., Hu D., Li C., Ge B., Jin B., Fan Z. Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell Death Differ.*, 2013, Vol. 20, no. 3, pp. 456-464.
64. Liu X.T., Sun H.T., Zhang Z.F., Shi R.X., Liu L.B., Yu J.J., Zhou W.J., Gu C.J., Yang S.L., Liu Y.K., Yang H.L., Xu F.X., Li M.Q. Indoleamine 2,3-dioxygenase suppresses the cytotoxicity of 1 NK cells in response to ectopic endometrial stromal cells in endometriosis. *Reproduction*, 2018, Vol. 156, no. 5, pp. 397-404.
65. Lopez J.A., Susanto O., Jenkins M.R., Lukyanova N., Sutton V.R., Law R.H., Johnston A., Bird C.H., Bird P.I., Whisstock J.C., Trapani J.A., Saibil H.R., Voskoboinik I. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 14, pp. 2659-2668.
66. Lu L., Zhang A.Y., Camp W.L., Qian S. Natural killer cell induction of tolerance. In book: natural killer cells. Basic science and clinical application. Academic Press, 2010, pp. 617-631.
67. Mace E.M., Dongre P., Hsu H.T., Sinha P., James A.M., Mann S.S., Forbes L.R., Watkin L.B., Orange J.S. Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. *Immunol. Cell Biol.*, 2014, Vol. 92, no. 3, pp. 245-255.
68. Maghazachi A.A. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2010, Vol. 341, pp. 37-58.
69. Mandelboim O., Lieberman N., Lev M., Paul L., Arnon T.I., Bushkin Y., Davis D.M., Strominger J.L., Yewdell J.W., Porgador A. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*, 2001, Vol. 409, no. 6823, pp. 1055-1060.
70. Mariuzza R.A., Agnihotri P., Orban J. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *J. Biol. Chem.*, 2020, Vol. 295, no. 4, pp. 914-925.
71. Matesanz-Isabel J., Sintes J., Llinas L., de Salort J., Lazaro A., Engel P. New B-cell CD molecules. *Immunol. Lett.*, 2011, Vol. 134, no. 2, pp. 104-112.
72. Mattioli I., Pesant M., Tentorio P.F., Molgora M., Marcenaro E., Lugli E., Locati M., Mavilio D. Priming of human resting NK cells by autologous M1 macrophages via the engagement of IL-1beta, IFN-beta, and IL-15 pathways. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 6, pp. 2818-2828.
73. McCann F.E., Vanherberghen B., Eleme K., Carlin L.M., Newsam R.J., Goulding D., Davis D.M. The size of the synaptic cleft and distinct distributions of filamentous actin, ezrin, CD43, and CD45 at activating and inhibitory human NK cell immune synapses. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 6, pp. 2862-2870.
74. McQuaid A., Tormey V.J., Trafford B., Webster A.D., Bofill M. Evidence for increased expression of regulatory cytokine receptors interleukin-12R and interleukin-18R in common variable immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, Vol. 134, no. 2, pp. 321-327.
75. Mei B., Zhang S.R., Chen Y.L., Wang C.F. Defects in NKG2D ligand expression result in failed tolerance induction at the maternal-fetal interface: a possible cause for recurrent miscarriage. *Med. Hypotheses*, 2012, Vol. 79, no. 4, pp. 465-467.
76. Meniailo M.E., Malashchenko V.V., Shmarov V.A., Gazatova N.D., Melashchenko O.B., Goncharov A.G., Seledtsova G.V., Seledtsov V.I. Direct effects of interleukin-8 on growth and functional activity of T lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.*, 2017, Vol. 50, pp. 178-185.
77. Metkar S.S., Wang B., Aguilar-Santelises M., Raja S.M., Uhlin-Hansen L., Podack E., Trapani J.A., Froelich C.J. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity*, 2002, Vol. 16, no. 3, pp. 417-428.
78. Meza Guzman L.G., Keating N., Nicholson S.E. Natural killer cells: tumor surveillance and signaling. *Cancers (Basel)*, 2020, Vol. 12, no. 4, 952. doi: 10.3390/cancers12040952.
79. Mihara M., Hashizume M., Yoshida H., Suzuki M., Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2012, Vol. 122, no. 4, pp. 143-159.

80. Mikhailova V.A., Bazhenov D.O., Belyakova K.L., Selkov S.A., Sokolov D.I. Differentiation of NK cells. A look through the prism of transcription factors and intercellular messengers. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 21-38. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-21-38.
81. Mikhailova V.A., Belyakova K.L., Selkov S.A., Sokolov D.I. Peculiarities of NK cells differentiation: CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells at pregnancy and in non-pregnant state. *Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 19-26. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-19-26.
82. Mincheva-Nilsson L., Baranov V. Cancer exosomes and NKG2D receptor-ligand interactions: impairing NKG2D-mediated cytotoxicity and anti-tumour immune surveillance. *Semin. Cancer Biol.*, 2014, Vol. 28, pp. 24-30.
83. Moffett A., Colucci F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 124, no. 5, pp. 1872-1879.
84. Moniuszko M., Kowal K., Jeznach M., Rusak M., Dabrowska M., Bodzenta-Lukaszyk A. Phenotypic correlations between monocytes and CD4⁺ T cells in allergic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2013, Vol. 161, no. 2, pp. 131-141.
85. Montaldo E., Del Zotto G., Della Chiesa M., Mingari M.C., Moretta A., De Maria A., Moretta L. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A*, 2013, Vol. 83, no. 8, pp. 702-713.
86. Montaldo E., Vitale C., Cottalasso F., Conte R., Glatzer T., Ambrosini P., Moretta L., Mingari M.C. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 17, pp. 3987-3996.
87. Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Cantoni C., Mingari M.C., Biassoni R., Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, Vol. 19, pp. 197-223.
88. Netter P., Anft M., Watzl C. Termination of the activating NK cell immunological synapse is an active and regulated process. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 199, no. 7, pp. 2528-2535.
89. Nieto M., Navarro F., Perez-Villar J.J., del Pozo M.A., Gonzalez-Amaro R., Mellado M., Frade J.M., Martinez A.C., Lopez-Botet M., Sanchez-Madrid F. Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, no. 7, pp. 3330-3339.
90. Nowak I., Wilczynska K., Wilczynski J.R., Malinowski A., Radwan P., Radwan M., Kusnierczyk P. KIR, LILRB and their Ligands' Genes as Potential Biomarkers in Recurrent Implantation Failure. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2017, Vol. 65, no. 5, pp. 391-399.
91. O'Leary J.G., Goodarzi M., Drayton D.L., von Andrian U.H. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat. Immunol.*, 2006, Vol. 7, no. 5, pp. 507-516.
92. Orange J.S. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 9, pp. 713-725.
93. Orange J.S., Harris K.E., Andzelm M.M., Valter M.M., Geha R.S., Strominger J.L. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003, Vol. 100, no. 24, pp. 14151-14156.
94. Orange J.S., Ramesh N., Remold-O'Donnell E., Sasahara Y., Koopman L., Byrne M., Bonilla F.A., Rosen F.S., Geha R.S., Strominger J.L. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2002, Vol. 99, no. 17, pp. 11351-11356.
95. Pahl J.H.W., Cerwenka A., Ni J. Memory-Like NK Cells: Remembering a Previous Activation by Cytokines and NK Cell Receptors. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2796. doi: 10.3389/fimmu.2018.02796.
96. Pende D., Parolini S., Pessino A., Sivori S., Augugliaro R., Morelli L., Marcenaro E., Accame L., Malaspina A., Biassoni R., Bottino C., Moretta L., Moretta A. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.*, 1999, Vol. 190, no. 10, pp. 1505-1516.
97. Phatarpekar P.V., Billadeau D.D. Molecular regulation of the plasma membrane-proximal cellular steps involved in NK cell cytolytic function. *J. Cell Sci.*, 2020, Vol. 133, no. 5, jcs240424. doi: 10.1242/jcs.240424.
98. Pollheimer J., Vondra S., Baltayeva J., Beristain A.G., Knofler M. Regulation of placental extravillous trophoblasts by the maternal uterine environment. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2597. doi: 10.3389/fimmu.2018.02597.
99. Prager I., Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 105, no. 6, pp. 1319-1329.
100. Qu X., Tang Y., Hua S. Immunological approaches towards cancer and inflammation: a cross talk. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 563. doi: 10.3389/fimmu.2018.00563.
101. Rajagopalan S., Long E.O. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 258. doi: 10.3389/fimmu.2012.00258.
102. Rajashekhar G., Loganath A., Roy A.C., Chong S.S., Wong Y.C. Hypoxia up-regulated angiogenin and down-regulated vascular cell adhesion molecule-1 expression and secretion in human placental trophoblasts. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 2005, Vol. 12, no. 5, pp. 310-319.

103. Rebuli M.E., Pawlak E.A., Walsh D., Martin E.M., Jaspers I. Distinguishing human peripheral blood NK cells from CD56(dim)CD16(dim)CD69(+)CD103(+) resident nasal mucosal lavage fluid cells. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 3394. doi: 10.1038/s41598-018-21443-5.
104. Regis S., Dondero A., Caliendo F., Bottino C., Castriconi R. NK cell function regulation by TGF-beta-induced epigenetic mechanisms. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 311. doi: 10.3389/fimmu.2020.00311.
105. Renoux V.M., Zriwil A., Peitzsch C., Michaelsson J., Friberg D., Soneji S., Sitnicka E. Identification of a human natural killer cell lineage-restricted progenitor in fetal and adult tissues. *Immunity*, 2015, Vol. 43, no. 2, pp. 394-407.
106. Romee R., Schneider S.E., Leong J.W., Chase J.M., Keppel C.R., Sullivan R.P., Cooper M.A., Fehniger T.A. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood*, 2012, Vol. 120, no. 24, pp. 4751-4760.
107. Rousalova I., Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). *Int. J. Oncol.*, 2010, Vol. 37, no. 6, pp. 1361-1378.
108. Sanchez-Correa B., Valhondo I., Hassouneh F., Lopez-Sejas N., Pera A., Bergua J.M., Arcos M.J., Banas H., Casas-Aviles I., Duran E., Alonso C., Solana R., Tarazona R. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE Axis: novel immune checkpoints for natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 2019, Vol. 11, no. 6, 877. doi: 10.3390/cancers11060877.
109. Schleinitz N., March M.E., Long E.O. Recruitment of activation receptors at inhibitory NK cell immune synapses. *PLoS One*, 2008, Vol. 3, no. 9, e3278. doi: 10.1371/journal.pone.0003278.
110. Sivori S., Vacca P., Del Zotto G., Munari E., Mingari M.C., Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell. Mol. Immunol.*, 2019, Vol. 16, no. 5, pp. 430-441.
111. Sokolov D.I., Markova K.L., Mikhailova V.A., Vyazmina L.P., Milyutina Y.P., Kozyreva A.R., Zhdanova A.A., Malygina D.A., Onokhin K.V., Ivanova A.N., Korenevsky A.V., Selkov S.A. Phenotypic and functional characteristics of microvesicles produced by natural killer cells. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 669-688. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-669-688.
112. Stenqvist A.C., Nagaeva O., Baranov V., Mincheva-Nilsson L. Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 11, pp. 5515-5523.
113. Stojanovic A., Correia M.P., Cerwenka A. Shaping of NK cell responses by the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.*, 2013, Vol. 6, no. 2, pp. 135-146.
114. Suarez-Fueyo A., Bradley S.J., Katsuyama T., Solomon S., Katsuyama E., Kyttaris V.C., Moulton V.R., Tsokos G.C. Downregulation of CD3zeta in NK cells from systemic lupus erythematosus patients confers a proinflammatory phenotype. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, no. 9, pp. 3077-3086.
115. Sun H., Sun C., Xiao W. Expression regulation of co-inhibitory molecules on human natural killer cells in response to cytokine stimulations. *Cytokine*, 2014, Vol. 65, no. 1, pp. 33-41.
116. Takahashi H., Yamamoto T., Yamazaki M., Murase T., Matsuno T., Chishima F. Natural cytotoxicity receptors in decidua natural killer cells of term normal pregnancy. *J. Pregnancy*, 2018, Vol. 2018, 4382084. doi: 10.1155/2018/4382084.
117. Takeda K., Kaisho T., Akira S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 21, pp. 335-376.
118. Thomas L.M., Peterson M.E., Long E.O. Cutting edge: NK cell licensing modulates adhesion to target cells. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 8, pp. 3981-3985.
119. Tufa D.M., Ahmad F., Chatterjee D., Ahrenstorf G., Schmidt R.E., Jacobs R. IL-1beta limits the extent of human 6-sulfo LacNAc dendritic cell (sLanDC)-mediated NK cell activation and regulates CD95-induced apoptosis. *Cell. Mol. Immunol.*, 2017, Vol. 14, no. 12, pp. 976-985.
120. Urlaub D., Hofer K., Muller M.L., Watzl C. LFA-1 Activation in NK Cells and their subsets: influence of receptors, maturation, and cytokine stimulation. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 5, pp. 1944-1951.
121. Vacca P., Vitale C., Montaldo E., Conte R., Cantoni C., Fulcheri E., Darretta V., Moretta L., Mingari M.C. CD34⁺ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, Vol. 108, no. 6, pp. 2402-2407.
122. van Buul J.D., Mul F.P., van der Schoot C.E., Hordijk P.L. ICAM-3 activation modulates cell-cell contacts of human bone marrow endothelial cells. *J. Vasc. Res.*, 2004, Vol. 41, no. 1, pp. 28-37.
123. van der Haar Avila I., Marmol P., Cany J., Kiessling R., Pico de Coana Y. Evaluating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.*, 2019, Vol. 1913, pp. 181-194.
124. van Horssen R., Ten Hagen T.L., Eggermont A.M. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*, 2006, Vol. 11, no. 4, pp. 397-408.
125. Voloshin T., Alishekevitz D., Kaneti L., Miller V., Isakov E., Kaplanov I., Voronov E., Fremder E., Benhar M., Machluf M., Apte R.N., Shaked Y. Blocking IL1beta pathway following paclitaxel chemotherapy slightly inhibits primary tumor growth but promotes spontaneous metastasis. *Mol. Cancer Ther.*, 2015, Vol. 14, no. 6, pp. 1385-1394.
126. Voskoboinik I., Whisstock J.C., Trapani J.A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no. 6, pp. 388-400.
127. Wang R., Jaw J.J., Stutzman N.C., Zou Z., Sun P.D. Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, Vol. 91, no. 2, pp. 299-309.

128. Wei J., Satomi M., Negishi Y., Matsumura Y., Miura A., Nishi Y., Asakura H., Takeshita T. Effect of sera on the adhesion of natural killer cells to the endothelium in severe pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2006, Vol. 32, no. 5, pp. 443-448.
129. Woodfin A., Voisin M.B., Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007, Vol. 27, no. 12, pp. 2514-2523.
130. Wu J., Gao F.X., Wang C., Qin M., Han F., Xu T., Hu Z., Long Y., He X.M., Deng X., Ren D.L., Dai T.Y. IL-6 and IL-8 secreted by tumour cells impair the function of NK cells via the STAT3 pathway in oesophageal squamous cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2019, Vol. 38, no. 1, 321. doi: 10.1186/s13046-019-1310-0.
131. Yamaguchi T., Kitaya K., Daikoku N., Yasuo T., Fushiki S., Honjo H. Potential selectin L ligands involved in selective recruitment of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium. *Biol. Reprod.*, 2006, Vol. 74, no. 1, pp. 35-40.
132. Yokoyama W.M., Riley J.K. NK cells and their receptors. *Reprod. Biomed. Online*, 2008, Vol. 16, no. 2, pp. 173-191.
133. Yu J., Freud A.G., Caligiuri M.A. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.*, 2013, Vol. 34, no. 12, pp. 573-582.
134. Zaiatz-Bittencourt V., Finlay D.K., Gardiner C.M. Canonical TGF-beta signaling pathway represses human NK cell metabolism. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, no. 12, pp. 3934-3941.
135. Zhang J., Liu J., Chen H., Wu W., Li X., Wu Y., Wang Z., Zhang K., Li Y., Weng Y., Liao H., Gu L. Specific immunotherapy generates CD8(+) CD196(+) T cells to suppress lung cancer growth in mice. *Immunol. Res.*, 2016, Vol. 64, no. 4, pp. 1033-1040.

Авторы:

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

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

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

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

Authors:

Tyshchuk E.V., Research Assistant, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

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

Поступила 02.04.2021
Отправлена на доработку 26.04.2021
Принята к печати 14.05.2021

Received 02.04.2021
Revision received 26.04.2021
Accepted 14.05.2021

РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ КОРОНАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А.,
Носков А.К.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Сведения, полученные в течение предыдущих эпидемий, вызванных коронавирусами, и текущей пандемии, свидетельствуют о том, что определение роли тех или иных иммунных реакций между этими вирусами и макроорганизмом является главным условием для разработки диагностических тест-систем, а также эффективных лекарственных и профилактических средств.

В обзоре систематизированы результаты изучения пато- и иммуногенеза SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2. Доказано, что эти коронавирусы подавляют формирование адаптивного иммунного ответа еще на стадии его индукции, влияют на количество и функциональную активность эффекторов клеточного иммунитета — лимфоцитов, вызывая нарушение лимфопоэза, апоптоз и «истощение» этих клеток, что приводит к более длительному течению заболевания и увеличению вирусной нагрузки.

Отражены сведения о роли клеточного звена иммунитета в формировании иммунного ответа к коронавирусам. Доказано, что возбудители SARS, MERS и COVID-19 запускают в макроорганизме формирование адаптивного иммунитета по гуморальному и клеточному типу. Причем синтез специфических иммуноглобулинов еще не свидетельствует о наличии протективного иммунного ответа. Не менее важным является активация клеточного звена иммунитета. Описана высокая степень гомологии антигенных эпитопов у SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2, что обуславливает возможность формирования перекрестного иммунитета к коронавирусам.

В обзоре рассмотрены вопросы, касающиеся длительности сохранения специфических клеток памяти к SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 и их роли в обеспечении длительной протективной защиты от этих инфекций. Учитывая, что специфические антитела к возбудителям SARS и MERS сохранялись в течение года, часто не выявлялись или регистрировались кратковременно у пациентов с легкой и бессимптомной формой инфекций, можно говорить о важной роли клеточного иммунного ответа в обеспечении иммунитета к данным коронавирусам.

Показано, что в отличие от антител, антигенспецифические Т-клетки памяти регистрировались у переболевших атипичной пневмонией от четырех до одиннадцати лет, ближневосточным острым респираторным синдромом — до двух лет. Для определения наличия и количества Т-клеток памяти при COVID-19 требуются дальнейшие исследования. Проведение сравнительного анализа данных, полученных во время предыдущих эпидемий, касающихся формирования адаптивного иммунитета

Адрес для переписки:

Иванова Инна Александровна
ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный
институт» Роспотребнадзора
344002, Россия, г. Ростов-на-Дону,
ул. Максима Горького, 117/40.
Тел.: 8 (863) 240-91-22.
Факс: 8 (863) 267-02-23.
E-mail: ivanova_ia@antiplague.ru

Address for correspondence:

Ivanova Inna A.
Rostov-on-Don Plague Control Research Institute
344002, Russian Federation, Rostov-on-Don,
Maxim Gorky str., 117/40.
Phone: 7 (863) 240-91-22.
Fax: 7 (863) 267-02-23.
E-mail: ivanova_ia@antiplague.ru

Образец цитирования:

И.А. Иванова, Н.Д. Омельченко, А.В. Филиппенко,
А.А. Труфанова, А.К. Носков «Роль клеточного звена
иммунитета в формировании иммунного ответа
при коронавирусных инфекциях» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1229-1238.
doi: 10.15789/1563-0625-ROT-2302
© Иванова И.А. и соавт., 2021

For citation:

I.A. Ivanova, N.D. Omelchenko, A.V. Filippenko,
A.A. Trufanova, A.K. Noskov "Role of the cellular immunity
in the formation of the immune response in coronavirus
infections", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1229-1238.
doi: 10.15789/1563-0625-ROT-2302
DOI: 10.15789/1563-0625-ROT-2302

к коронавирусам, описание белков и эпитопов, распознаваемых Т-лимфоцитами человека, будет полезно при мониторинге иммунных реакций у пациентов с COVID-19, а также при создании информативных тестов для изучения Т-клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 и новых профилактических препаратов.

Ключевые слова: SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, клеточный иммунный ответ, Т-лимфоциты, клетки памяти

ROLE OF THE CELLULAR IMMUNITY IN THE FORMATION OF THE IMMUNE RESPONSE IN CORONAVIRUS INFECTIONS

Ivanova I.A., Omelchenko N.D., Filippenko A.V., Trufanova A.A., Noskov A.K.

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The data obtained during previous epidemics caused by coronaviruses, and current pandemic indicate that assessing the role of certain immune interactions between these viruses and the macroorganism is the main pre-requisite for development of diagnostic test systems as well as effective medical drugs and preventive measures. The review summarizes the results of studying patho- and immunogenesis of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 infections. These coronaviruses were proven to suppress development of adaptive immune response at the stage of its induction, affecting the number and functional activity of lymphocytes, effectors of cellular immunity, causing impairment of lymphopoiesis, apoptosis and «depletion» of these cells, thus leading to longer duration of the disease and increased viral load. Information about the role of cellular immunity in development of immune response to coronaviruses is presented. It was proven that the causative agents of SARS, MERS and COVID-19 trigger adaptive immune response in the macroorganism according to both humoral and cellular types. Moreover, the synthesis of specific immunoglobulins does not yet point to presence of protective immune response. Activation of the cellular link of immunity is also important. A high degree of antigenic epitope homology in SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 is described, thus suggesting an opportunity for cross-immunity to coronaviruses. The review addresses issues related to the terms of specific memory immune cells to SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2, and their role in providing long-term protection against these infections. Given that specific antibodies to SARS and MERS pathogens persisted for a year, were often not detected or briefly registered in patients with mild and asymptomatic infections, we can talk about important role of the cellular immune response in providing immunity to these coronaviruses. It was shown that, in contrast to antibodies, the antigen-specific memory T cells were registered in patients with SARS virus for 4 to 11 years, and Middle East Respiratory Syndrome – up to two years. Further research is needed to determine presence and number of memory T cells in COVID-19. A comparative analysis of data obtained during previous epidemics with respect to formation of adaptive immunity to coronaviruses. Description of proteins and epitopes recognized by human T lymphocytes will be useful in monitoring immune responses in COVID-19 patients, as well as in developing informative tests to study T cell immune response to SARS-CoV-2 and new preventive drugs.

Keywords: SARS-Cov, MERS-Cov, SARS-CoV-2, cellular immune response, T lymphocytes, memory cells

Вирусы, относящиеся к семейству Coronaviridae, способны вызывать у человека в верхних и нижних дыхательных путях патологические процессы различной степени тяжести. Коронавирусы 229E, NL63, OC43, HKU1 являются причиной ОРВИ. Коронавирус SARS-CoV – этиологический агент атипичной пневмонии или тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС) или SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome), а MERS-CoV – ближневосточного острого респираторного синдрома (ОРДС) или MERS (Middle East Respiratory Syndrome). В 2019 г. идентифицирован и охарактеризован новый коронавирус nCoV-2019, позднее переименованный в SARS-CoV-2. Он явился причиной пандемии острого респираторного синдрома (COVID-19 – Corona Virus Disease 2019) [46, 66]

Данные, накопленные при исследовании пато- и иммуногенеза SARS-CoV и MERS-CoV, свидетельствуют о том, что создание эффектив-

ных лекарственных и профилактических средств невозможно без расшифровки различных иммунных механизмов и реакций между коронавирусами и клетками макроорганизма — от взаимодействия вирусных частиц с рецепторами до формирования специфического иммунитета.

Потребность в разработке тестов для диагностики и оценки иммунной прослойки населения обусловили многочисленные исследования гуморального иммунного ответа к новым коронавирусам. Однако результаты, полученные при изучении возбудителей MERS и SARS, доказывают, что наличие антител не является гарантом формирования стойкого протективного иммунитета [7], а важную роль играет клеточный иммунный ответ на эти коронавирусы [8, 76]. Исследования, которые проводились учеными во всем мире в течение текущей пандемии, демонстрируют, что у больных COVID-19 регистрируется как В-клеточный, так и Т-клеточный иммунитет [24, 47, 54]. Кроме того, выявленная у возбудителей MERS, SARS и COVID-19 высокая степень гомологии белков S, М, Е и N, являющихся антигенными эпитопами, способными индуцировать иммунный ответ, свидетельствует о возможности формирования перекрестного иммунитета к коронавирусам [71]. В связи с вышеизложенным, обобщение полученных в течение предыдущих эпидемий сведений о механизмах формирования адаптивного иммунитета к коронавирусам может быть полезным для совершенствования стратегии лечения и профилактики в условиях текущей пандемии.

Как и другие патогены, коронавирусы активируют в организме врожденную систему иммунитета.

Проникновение в цитоплазму клеток хозяев у коронавирусов начинается со связывания S-белка с рецепторами этих клеток [33, 78]. Для SARS-CoV и SARS-CoV-2 доминирующим рецептором хозяина является ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) [31, 38, 48]. Причем ACE2 имеет более высокое сродство к SARS-CoV-2, чем к SARS-CoV [67]. Для SARS-CoV ко-рецепторами служат также DC-SIGN (CD209) и L-SIGN (CD209L) [11, 27]. Кроме того, показано, что инвазия SARS-CoV-2 может осуществляться с помощью CD147 [60, 63, 68]. Для MERS-CoV клеточным рецептором является дипептидил-пептидаза 4 (DPP4, CD26) [42].

На стадии адсорбции на клеточной мембране вирус идентифицирует Toll-подобные рецепторы (TLR) 3, 7 и 8, а позднее — на стадии репликации вирусного генома — цитозольные рецепторы RIG-I и MDA5 из семейства RIG-подобных рецепторов (RLR). В результате активации этих рецепторов индуцируется выработка интерфе-

ронов (IFN) I и III типов, а также провоспалительных цитокинов [2, 55]. Однако SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 способны подавлять раннюю продукцию IFN, что является как механизмом уклонения от иммунной системы, так и одним из важных факторов вирулентности [2, 41, 58]. Позднее высвобождение IFN I типа вызывает массивную секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов [23, 53, 78], миграцию макрофагов, нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов из кровотока в очаг инфекции. Гиперпродукция цитокинов приводит к гиперактивации иммунных клеток и усилению патологического процесса в нижних дыхательных путях [3, 10, 61].

Далее в организме запускаются механизмы специфической иммунной защиты. Со своей стороны, коронавирусы способны подавлять формирование адаптивного иммунного ответа еще на стадии его индукции. Например, белок nsp6 SARS-CoV ингибирует слияние аутофагосом с лизосомами [2, 15], что препятствует представлению вирусных антигенов дендритными клетками в комплексе с молекулами MHC II класса. Ранее показано, что из-за генетического полиморфизма системы HLA, некоторые гаплотипы восприимчивы, а некоторые защищены от возбудителя атипичной пневмонии [34, 64]. Также обнаружена уязвимость HLA-DRB1*11 и HLA-DQB1*02 к возбудителю MERS [29]. У пациентов с COVID-19 описана способность блокировать экспрессию HLA-DR на CD14⁺ моноцитах, что может являться одной из причин нарастания гипервоспалительных состояний [25, 55].

При анализе антигенов, представляемых комплексом MHC Т-лимфоцитов, установлено, что у пациентов с атипичной пневмонией Т-клетки могут быть стимулированы четырнадцатью белками, но основную роль играет S-белок [65]. Показано, что только он активировал CD8⁺Т-лимфоциты [32]. У больных с ближневосточным респираторным синдромом ответ цитотоксических лимфоцитов был направлен против S- и N-белков и некоторых эпитопов М- и Е-белков [76]. У выздоравливающих пациентов с COVID-19 обнаружены CD4⁺Т-клетки, специфичные S-, М- и N-белкам возбудителя [20, 45]. Иммуногенные эпитопы этих белков активировали CD8⁺Т-лимфоциты [26]. Интересно, что подобный Т-клеточный ответ был выявлен не только у выздоровевших пациентов, но также присутствовал у 40-60% лиц, не инфицированных SARS-CoV-2, что свидетельствует о наличии у них перекрестно-реактивных CD4⁺Т-клеток, которые сформировались в ответ на какую-то предыдущую коронавирусную инфекцию и могли, возможно, обеспечить защитный иммунитет против SARS-CoV-2 [55].

О важности специфического Т-клеточного иммунного ответа при инфекциях, вызванных коронавирусами, свидетельствуют данные, полученные в результате экспериментальных [16] и клинических исследований [17] во время изучения пато- и иммуногенеза MERS-CoV и SARS-CoV. Выявлено, что эти коронавирусы работали механизмы, позволяющие им влиять на количество и функциональную активность эффекторов клеточного иммунитета – лимфоцитов. Они способны вызывать нарушение лимфопоэза, индукцию апоптоза, приводящую к более длительному течению заболевания и увеличению вирусной нагрузки [71], адгезию лимфоцитов к эндотелию сосудов и снижению их циркуляции в сосудистом русле [52].

Li T. и соавт. (2004) обнаружили резкое уменьшение субпопуляций Т-клеток периферической крови у пациентов с SARS в острой фазе заболевания при неизменном содержании лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов. В процессе реконвалесценции нарушенные показатели восстанавливались [37]. Показано, что острая фаза атипичной пневмонии у людей сопровождалась резким снижением CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток и выраженной лейкопенией у 80% пациентов [28]. Причем количество CD8⁺Т-лимфоцитов нормализовалось через 2-3 месяца, CD4⁺Т-клеток памяти – через год после начала заболевания, а число CD3⁺ и CD4⁺Т-лимфоцитов оставалось достоверно ниже, чем у здоровых из контрольной группы [39].

Лимфоцитопения также наблюдалась у пациентов с MERS, хотя и в меньшей степени, чем у заболевших атипичной пневмонией [28]. Было выявлено, что в инфицированных MERS-CoV Т-клетках под влиянием белка Е наружной мембраны возбудителя происходит активация апоптоза, ингибция эффекторной стадии Т-клеточного ответа [53, 70].

Выраженная лимфоцитопения и подавление клеточного иммунного ответа регистрировались при тяжелом и среднетяжелом течении COVID-19. Также у заболевших отмечались нейтрофилия (74,3%) и тромбоцитопения (24,3%) [53]. Развитие лимфоцитопении у тяжелых пациентов, особенно в течение первой недели заболевания, было связано со снижением абсолютного количества CD4⁺ и особенно CD8⁺Т-лимфоцитов [43, 55, 62, 72] и в меньшей степени В-лимфоцитов и естественных киллеров. Минимальные уровни CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток наблюдались на 4-6-й день после начала заболевания. При благоприятном исходе количество Т-лимфоцитов восстанавливалось до таковых у пациентов с легким течением болезни [40]. Qin C. и соавт. (2020) получены данные, свидетельствующие об

уменьшении у больных COVID-19 хелперных и супрессорных Т-лимфоцитов, а также Т-клеток памяти [50]. У многих заболевших были зарегистрированы нарушение баланса CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов [56], снижение способности продуцировать TNF α и IFN γ [43].

Описан вызываемый SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 феномен лимфоцитарного «истощения» у инфицированных [5, 51], обусловленный как прямой атакой коронавирусов на лимфоциты, так и индукцией апоптоза этих клеток [13, 49, 72].

Течение SARS сопровождается «истощением» CD4⁺Т-клеток, снижением количества CD8⁺ лимфоцитов и нарушением ими продукции IFN γ , а также, в конечном итоге, синтеза нейтрализующих антител [11, 12, 53, 73]. При экспериментальном изучении MERS получены доказательства того, что «истощение» CD8⁺Т-лимфоцитов ухудшает клиническую картину заболевания, но не влияет на титр противовирусных антител [14]. SARS-CoV-2 способен подавлять иммунный ответ, вызывая «истощение» CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ лимфоцитов и NK-клеток [18, 55]. Zheng M. и соавт. (2020) показано, что усиление экспрессии NKG2A на NK-клетках и CD8⁺Т-клетках у пациентов с тяжелым течением COVID-19 приводило к снижению их функциональной активности. Сделан вывод о том, что экспрессия NKG2A коррелирует с «истощением» эффекторных лимфоцитов на ранней стадии заболевания, усугубляя его течение [77].

У пациентов с тяжелым течением атипичной пневмонии выявлялось снижение активации Т-клеток [6, 30]. Тогда как у больных COVID-19 в некоторых случаях наблюдалась их гиперактивация [35], проявляющаяся увеличением числа Th17, высокой цитотоксичностью CD8⁺Т-лимфоцитов и избыточным иммунным ответом на SARS-CoV-2 [72].

При экспериментальной атипичной пневмонии выявлено, что специфичные CD4⁺Т-лимфоциты, локализованные в дыхательных путях, имеют решающее значение для защиты от SARS, обеспечивая у животных иммунный ответ в ранние и поздние сроки после заражения, в том числе и через продукцию IFN γ [75]. Специфичные CD4⁺Т-клетки продуцируют также TNF α и IL-2, что характеризует Th1-клеточный ответ и свидетельствует о формировании клеточного иммунитета [12, 32]. Иммунизация мышей дендритными клетками, несущими пептиды штамма SARS-CoV, адаптированного для этих животных, вызывала увеличение числа специфических CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, которые накапливались в легких и способствовали увеличению выживае-

мости. Также на мышинной модели показано, что интраназальное введение CD4⁺T-лимфоцитов памяти обеспечивало защиту от этого коронавируса. Повторное применение CD4⁺T-клеток памяти стимулировало выработку IFN γ и активизацию специфических CD8⁺T-лимфоцитов, обеспечивающих элиминацию возбудителя атипичной пневмонии [8, 9].

При MERS Т-клетки также выполняют главную защитную функцию. Так, экспериментально доказано, что у животных, лишенных Т-лимфоцитов, наблюдается длительная персистенция возбудителя [74]. Показана решающая роль в элиминации MERS-CoV специфических CD8⁺T-лимфоцитов как во время первичной, так и во время вторичной инфекции.

Анализ данных пациентов с COVID-19 показал, что у заболевших количество и функциональная активность CD8⁺T-лимфоцитов были выше по сравнению с CD4⁺T-клетками [36]. При тяжелых случаях заболевания отмечена высокая продукция IFN γ , TNF α , IL-2 специфическими CD4⁺T-лимфоцитами, а CD8⁺T-клетками — IFN γ , TNF α . У умерших пациентов было диагностировано большое количество IL-4, IL-5, IL-10, характерных для Th2-клеточного иммунного ответа [52]. Экспериментальные данные, полученные Elizaldi S. и соавт. (2020), свидетельствуют о накоплении на 7-е сутки в крови, легких и лимфатических узлах макаков-резусов Th1- и Th17-лимфоцитов. SARS-CoV-2-специфические CD4⁺T-клетки обнаруживались также в периферической крови выздоровевших пациентов [20].

После элиминации вируса большая часть эффекторных Т-клеток подвергается апоптозу. Остальные образуют пул Т-клеток памяти. При повторном заражении CD4⁺T-лимфоцитов памяти активируют В-лимфоциты и другие иммунокомпетентные клетки, в то время как цитотоксические Т-лимфоциты памяти участвуют в уничтожении инфицированных клеток [55].

Zhao J. и соавт. (2016) показали, что CD4⁺T-клетки памяти дыхательных путей препятствовали заражению SARS-CoV и MERS-CoV [75]. Channappanavar R. и соавт. (2014) показана способность специфических CD8⁺T-клеток памяти защищать мышей от возбудителя SARS в отсутствие CD4⁺T-лимфоцитов или В-клеток, хотя наличие специфических для SARS-CoV CD4⁺T-клеток и антител способствует наиболее полноценной защите [9].

У пациентов, переболевших SARS, CD4⁺ и CD8⁺T-клетки памяти регистрировались от нескольких месяцев до нескольких лет [22]. Так, CD4⁺T-лимфоциты выявлялись у выздоровевших от 4 до 6 лет [57, 69], а специфические

CD8⁺T-лимфоциты — через 6 [9] и даже через 11 лет после заболевания [44]. Продолжительность сохранения Т-клеток памяти коррелировала с тяжестью перенесенной инфекции [57]. Следует отметить, что специфические для SARS-CoV IgM и IgA обнаруживались около 6 месяцев, а IgG в течение одного года, это свидетельствует о недостаточной роли В-клеточного звена иммунитета в обеспечении длительной протективной защиты от этой инфекции [10, 21].

У выздоровевших после инфицирования MERS-CoV Т-клетки памяти сохранялись до 2 лет, в том числе у пациентов с низким титром антител, что позволяет говорить о важной роли клеточного иммунного ответа в обеспечении иммунитета к данному возбудителю [76]. Тем более, что специфические для MERS антитела не выявляются или регистрируются кратковременно у пациентов с легкой и бессимптомной формой инфекции [4, 19].

При легком течении COVID-19 также наблюдается активация Т-клеточного звена иммунитета, образование популяции Т-клеток памяти на фоне низкой продукции антител [24, 59]. У большинства пациентов при тяжелом и длительном заболевании вырабатываются и антитела, и Т-клеточный ответ, причем величина этих двух факторов часто коррелирует с тяжестью инфекции [45]. Достаточен ли ответ Т-клеток памяти для защиты от реинфекции COVID-19, нуждается в дальнейшем изучении [52]. В недавних сообщениях показано, что наряду со снижением регуляторных популяций Т-лимфоцитов низкое количество Т-клеток памяти может усугублять воспалительную реакцию, приводящую к цитокиновому шторму и, следовательно, повреждению тканей и органной недостаточности [50, 55].

Таким образом, коронавирусы запускают в макроорганизме формирование адаптивного иммунитета по гуморальному и клеточному типу. Причем синтез специфических иммуноглобулинов еще не свидетельствует о наличии стойкого протективного иммунитета. Полученные во время прошлых эпидемий и в ходе текущей пандемии сведения доказывают не менее важную роль клеточного иммунного ответа на эти коронавирусы [10, 24, 47, 54, 76]. Число серологически подтвержденных случаев новой коронавирусной инфекции говорит о том, что фактическая заболеваемость значительно выше, и определение только продукции специфических иммуноглобулинов при коронавирусных инфекциях не может служить надежным маркером, отражающим всю полноту формирования адаптивного иммунного ответа [1]. В настоящее время существует настоятельная необходимость в разработке информа-

тивных тестов для изучения Т-клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2. Расшифровка механизмов CD4⁺ и CD8⁺Т-клеточных реакций, определение белков и эпитопов, распознаваемых Т-лимфоцитами человека, позволит осуществлять мониторинг иммунных реакций при

COVID-19, определять их роль в пато- и иммуногенезе возбудителя, в том числе и у разных возрастных категорий пациентов. Кроме того, полученные данные будут полезны как при создании новых вакцинных препаратов, так и при оценке их иммуногенности.

Список литературы / References

1. Костинов М.П., Шматько А.Д., Полищук В.Б., Хромова Е.А. Современные представления о новом коронавирусе и заболевании, вызванном SARS-CoV // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение, 2020. Т. 9, № 2. С. 33-42. [Kostinov M.P., Shmatko A.D., Polishchuk V.B., Khromova E.A. Modern ideas about the new coronavirus and the disease caused by SARS-CoV. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* = *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2020, Vol. 9, no. 2, pp. 33-42. (In Russ.)]
2. Пашенков М.В., Хаитов М.Р. Иммунный ответ против эпидемических коронавирусов. Иммунология, 2020. Т. 41, № 1. С. 5-18. [Paschenkov M.V., Khaitov M.R. Immune response against epidemic coronaviruses. *Immunologiya* = *Immunologiya*, 2020, Vol. 41, no. 1, pp. 5-18. (In Russ.)]
3. Смирнов В.С., Тотолян А.А. Врожденный иммунитет при коронавирусной инфекции. Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 2. С. 259-268. [Smirnov V.S., Totolyan A.A. Innate immunity in coronavirus infection. *Infektsiya i immunitet* = *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 2, pp. 259-268. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-111-1440.
4. Alshukairi A.N., Khalid I., Ahmed W.A., Dada A.M., Bayumi D.T., Malic L.S., Althawadi S., Ignacio K., Alsalmi H.S., Al-Abdali H.M., Wali G.Y., Kushak I.A., Alraddadi B.M., Perlman S. Antibody response and disease severity in healthcare worker MERS survivors. *Emerg. Inf. Dis.*, 2016, no. 22, pp. 1113-1115.
5. Al-Tawfiq J.A., Hinedi K., Abbasi S., Babiker M., Sunji A., Eltigani M. Hematologic, hepatic and renal function changes in hospitalized patients with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2017, Vol. 39, no. 3, pp. 272-278.
6. Cameron M.J., Bermejo-Martin J.F., Danesh A., Muller M.P., Kelvin D.J. Human immunopathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). *Virus Res.*, 2008, Vol. 133, no. 1, pp. 13-19.
7. Chandrashekar A., Liu J., Martinot A.J., McMahan K., Mercado N.B., Peter L., Tostanoski L.H., Yu J., Maliga Z., Nekorchuk M., Busman-Sahay K., Terry M., Wrijil L.M., Ducat S., Martinez D.R., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Slein M.D., Pessaint L., Ry A.V., Greenhouse J., Taylor T., Blade K., Cook A., Finneyfrock B., Brown R., Teow E., Velasco J., Zahn R., Wegmann F., Abbink P., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., He X., JacobDonal C., Kordana N., Li Z., Lifton M.A., Mahrokhian S.H., Maxfield L.F., Nityanandam R., Nkolola J.P., Schmidt A.G., Miller A.D., Baric R.S., Alter G., Sorger P.K., Estes J.D., Andersen H., Lewis M.G., Barouch D.H. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science*, 2020, Vol. 369, no. 6505, pp. 812-817.
8. Channappanavar R., Zhao J., Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunol. Res.*, 2014, Vol. 59, no. 1, pp. 118-128.
9. Channappanavar R., Fett C., Zhao J., Meyerholz D.K., Perlman S. Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Virol.*, 2014, Vol. 88, no. 19, pp. 11034-11044.
10. Channappanavar R., Fehr A.R., Zheng J., Wohlford-Lenane C., Abrahante J.E., Mack M., Sompallae R., McCray P.B. Jr, Meyerholz D.K., Perlman S. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J. Clin. Invest.*, 2019, Vol. 129, no. 9, pp. 625-639.
11. Chen J., Subbarao K. The immunobiology of SARS. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, no. 25, pp. 443-472.
12. Chen J., Lau Y.F., Lamirande E.W., Paddock C.D., Bartlett J.H., Zaki S.R., Subbarao K. Cellular immune responses to Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c Mice: CD4⁺ T cells are important in control of SARS-CoV Infection. *J. Virol.*, 2010, Vol. 84, no. 3, pp. 1289-1301.
13. Chu H., Zhou J., Wong B.H., Li C., Chan J.F., Cheng Z.S., Yang D., Wang D., Chak-Yiu L.A., Li C., Yeung M., Cai J., Chan I.H., Ho W., To K.K., Zheng B., Yao Y., Qin C., Yuen K. Middle East Respiratory Syndrome coronavirus efficiently infects human primary T lymphocytes and activates the extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *J. Infect. Dis.*, 2016, Vol. 213, no. 6, pp. 904-914.
14. Corman V.M., Albarrak A.M., Omrani A.S., Albarrak M.M., Farah M.E., Almasri M., Muth D., Sieberg A., Meyer B., Assiri A.M. Viral shedding and antibody response in 37 patients with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus infection. *Clin. Infect. Dis.*, 2016, Vol. 62, pp. 477-483.
15. Cottam E.M., Whelband M.C., Wileman T. Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. *Autophagy*, 2014, Vol. 10, no. 8, pp. 1426-1441.
16. de Wit E., van Doremalen N., Falzarano D., Munster V.J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2016, Vol. 14, no. 8, pp. 523-534.

17. Deng X., van Geelen A., Buckley A.C., O'Brien A., Pillatzki A., Lager K.M., Faaberg K.S., Baker S.C. Coronavirus endoribonuclease activity in porcine epidemic diarrhea virus suppresses type I and type III interferon responses. *J. Virol.*, 2019, Vol. 93, no. 8, e02000-18. doi: 10.1128/JVI.02000-18.
18. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827.
19. Drosten C., Meyer B., Muller M.A., Corman V.M., Al-Masri M., Hossain R., Madani H., Sieberg A., Bosch B.J., Lattwein E., Alhakeem R.f., Assiri A.M., Hajomar W., Albarrak A., Al-Tawfiq J.A., Zumla A., Memish Z. Transmission of MERS coronavirus in household contacts. *N. Engl. J. Med.*, 2014, Vol. 371, pp. 828-835.
20. Elizaldi S., Lakshmanappa Y.S., Roh J., Schmidt B., Carroll T., Weaver K., Smith J.C., Deere J.D., Dutra J., Stone M., Sammak R.L., Olstad K.J., Reader J.R., Ma Z.-M., Nguyen N.K., Watanabe J., Usachenko J., Immareddy R., Yee J.L., Weiskopf D., Sette A., Hartigan-O'Connor D., McSorley S.J., Morrison J.H., Tran N.K., Simmons G., Busch M.P., Kozlowski P.A., Van Rompay K.K.A., Miller C.J., Iyer S.S. SARS-CoV-2 infection induces robust germinal center CD4 T follicular helper cell responses in rhesus macaques. *Res. Sq. Preprint*, 2020. doi: 10.21203/rs.3.rs-51545/v1.
21. Enjuanes L., Zuniga S., Castano-Rodriguez C., Gutierrez-Alvarez J., Canton J., Sola I. Molecular basis of coronavirus virulence and vaccine development. *Adv. Virus Res.*, 2016, Vol. 96, pp. 245-286.
22. Fan Y.-Y., Huang Z.-T., Li L., Wu M.-H., Yu T., Koup R.A., Bailer R.T., Wu C.-Y. Characterization of SARS-CoV-specific memory T cells from recovered individuals 4 years after infection. *Arch. Virol.*, 2009, Vol. 154, no. 7, pp. 1093-1099.
23. Frieman M., Heise M., Baric R. SARS coronavirus and innate immunity. *Virus. Res.*, 2008, Vol. 133, no. 1, pp. 101-112.
24. Gallais F., Velay A., Wendling M.-J., Nazon C., Partisani M., Sibilia J., Candon S., Fafi-Kremer S. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 induces cellular immune response without seroconversion. *medRxiv* 2020.06.21.2013244. Preprint, 2020. doi: 10.1101/2020.06.21.20132449.
25. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Antoniadou A., Antonakos N., Damoraki G., Gkavogianni T., Adami M.-E., Katsounou P., Ntaganou M., Kyriakopoulou M., Dimopoulos G., Koutsodimitropoulos I., Velissaris D., Koufargyris P., Karageorgos A., Katrini K., Lekakis V., Lupse M., Kotsaki A., Renieris G., Theodoulou D., Panou V., Koukaki E., Koulouris N., Gogos C., Koutsoukouet A. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe*, 2020, Vol. 27, no. 6, pp. 992-1000.
26. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Jennifer M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jadi R.S., Marrama D., de Silva A.M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., Sette A. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 2020, Vol. 181, pp. 1489-1501.
27. Gu J., Korteweg C. Pathology and pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome. *Am. J. Pathol.*, 2007, Vol. 170, pp. 1136-1147.
28. Guihot A., Litvinova E., Autran B., Debré P., Vieillard V. Cell-mediated immune responses to COVID-19 infection. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1662. doi: 10.3389/FIMMU.2020.01662.
29. Hajeer A.H., Balkhy H., Johani S., Yousef M.Z., Arabi Y. Association of human leukocyte antigen class II alleles with severe Middle East Respiratory Syndrome-coronavirus infection. *Ann. Thorac. Med.*, 2016, Vol. 11, pp. 211-213.
30. He Z., Zhao C., Dong Q., Zhuang H., Song S., Peng G., Dwyer D.E. Effects of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) coronavirus infection on peripheral blood lymphocytes and their subsets. *Int. J. Infect.*, 2005, Vol. 9, pp. 323-330.
31. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 2020, Vol. 181, pp. 271-280.
32. Ka-fai L.C., Wu H., Yan H., Ma S., Wang L., Zhang M., Tang X., Temperton N.J., Weiss R.A., Brenchley J.M., Douek D.C., Mongkolsapaya J., Tran B.-H., Steve Lin C.-I., Screaton G.R., Hou J.-I., McMichael A.J., Xet X.-N. T cell responses to whole SARS coronavirus in humans. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, pp. 5490-5500.
33. Kaul D. An overview of coronaviruses including the SARS-2 coronavirus – Molecular biology, epidemiology and clinical implications. *Curr. Med. Res. Pract.*, 2020, Vol. 10, no. 2, pp. 54-64.
34. Keicho N., Itoyama S., Kashiwase K., Phi N.C., Long H.T., Ha L.D., Ban V.V., Hoa B.K., Le Hang N.T., Hijikata M., Sakurada S., Satake M., Tokunaga K., Sasazuki T., Quy T. Association of human leukocyte antigen class II alleles with Severe Acute Respiratory Syndrome in the Vietnamese population. *Hum. Immunol.*, 2009, Vol. 70, pp. 527-531.
35. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R., Agyekum R., Mathew D., Baxter A.E., Vella L., Kuthuru O., Apostolidis S., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A.R., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., Weirick M.E., Arevalo C.P., Bolton M.J., Goodwin E.C., Anderson E.M., Hensley S.E.,

Jones T.K., Mangalmurti N.S., Luning Prak E.T., Wherry E.J., Meyer N.J., Bettset M.R. Immunologic perturbations in severe COVID-19/SARS-CoV-2 infection. Version 1. bioRxiv. Preprint, 2020. doi: 10.1101/2020.05.18.101717.

36. Li G., Fan Y., Lai Y., Han T., Li Z., Zhou P., Pan P., Wang W., Hu D., Liu X., Zhang Q., Wu J. Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.*, 2020, Vol. 92, no. 4, pp. 424-432.

37. Li T., Qiu Z., Zhang L., Han Y., He W., Liu Z., Ma X., Fan H., Lu W., Xie J., Wang H., Deng G., Wang A. Significant changes of peripheral T lymphocyte subsets in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *J. Infect. Dis.*, 2004, Vol. 189, no. 4, pp. 648-651.

38. Li W., Wong S.K., Li F., Kuhn J.H., Huang I-C., Choe H., Farzan M. Animal origins of the severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus: insight from ACE2-S-Protein interactions. *J. Virol.*, 2006. Vol. 80, no. 9, pp. 4211-4219.

39. Lin L., Lu L., Cao W., Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection-a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, Vol. 9, no. 4, pp. 1-4.

40. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., Li W., Tong Q., Yi J., Zhao L., Xiong L., Guo C., Tian J., Luo J., Yao J., Pang R., Shen H., Peng C., Liu T., Zhang Q., Wu J., Xu L., Lu S., Wang B., Weng Z., Han C., Zhu H., Zhou R., Zhou H., Chen X., Ye P., Zhu B., Wang L., Zhou W., He S., He Y., Jie S., Wei P., Lu Y., Wang W., Zhang L., Li L., Zhou F., Wang J., Dittmer U., Lu M., Hu Y., Yang D., Zheng X. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*, 2020, Vol. 55, 102763. doi: 10.1016/J.EBIO.M.2020.102763.

41. Lui P.-Y., Wong L.-Y. R., Fung C.-L., Siu K.-L., Yeung M.-L., Yuen K.-S., Chan C.-P., Woo P.C.-Y., Yuen K.-Y., Jin D.-Y. Middle East Respiratory Syndrome corona-virus M protein suppresses type I interferon expression through the inhibition of TBK1-dependent phosphorylation of IRF3. *Emerg. Microbes Infect.*, 2016, Vol. 5, no. 4, e39. doi: 10.1038/EMI.2016.33.

42. Lu G., Hu Y., Wang Q., Qi J., Gao F., Li Y., Zhang Y., Zhang W., Yuan Y., Bao J., Zhang B., Shi Y., Yan J., Gao G.F. Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature*, 2013, Vol. 500, pp. 227-231.

43. Mazzone A., Salvati L., Maggi L., Capone M., Vanni A., Spinicci M., Mencarini J., Caporale R., Peruzzi B., Antonelli A., Trotta M., Zammarchi L., Ciani L., Gori L., Lazzeri C., Matucci A., Vultaggio A., Rossi O., Almerigogna F., Parronchi P., Fontanari P., Latorini F., Peris A., Rossolini G.M., Bartoloni A., Romagnani S., Liotta F., Annunziato F., Cosmi L. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. *J. Clin. Invest.*, 2020, Vol. 130, no. 9, pp. 4694-4703.

44. Ng O.W., Chia A., Tan A.T., Jada R.S., Leong H.N., Bertolotti A., Tan Y.-J. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine*, 2016, Vol. 34, no. 17, pp. 2008-2014.

45. Ni L., Ye F., Cheng M.-L., Feng Y., Deng Y.-Q., Zhao H., Wei P., Ge J., Gou M., Li X., Sun L., Cao T., Wang P., Zhou C., Zhang R., Liang P., Guo H., Wang X., Qin C.-F., Chen F., Dong C. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity*, 2020, Vol. 52, no. 6, pp. 971-977.

46. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report – 11. World Health Organisation (January 31, 2020). Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200131-sitrep-11-ncov.pdf?sfvrsn=de7c0f7_4.

47. Oja A.E., Saris A., Ghandour C.A., Kragten N.A.M., Hogema B.M., Nossent L.M., Heunks A., Cuvalay S., Slot E., Swaneveld F.H., Vrieling H., Rispens T., van der Schoot E.J.E., van Lier R.A.W., Ten Brinke A., Hombrink P. Divergent SARS-CoV-2-specific T and B cell responses in severe but not mild COVID-19. bioRxiv 2020.06.18.159202. Preprint, 2020. doi: 10.1101/2020.06.18.159202.

48. Ou X., Liu Y., Lei X., Li P., Mi D., Ren L., Guo L., Guo R., Chen T., Hu J., Xiang Z., Mu Z., Chen X., Chen J., Hu K., Jin Q., Wang J., Qian Z. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.

49. Panesar N.S. What caused lymphopenia in SARS and how reliable is the lymphokine status in glucocorticoid-treated patients? *Med. Hypotheses*, 2008, Vol. 71, no. 2, pp. 298-301.

50. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., Tian D.S. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 71, pp. 762-768.

51. Rabaan A.A., Al-Ahmed S.H., Haque S., Sah R., Tiwari R., Malik Y.S., Dhama K., Yatoo M.I., Bonilla-Aldana D.K., Rodriguez-Morales A.J. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a comparative overview. *Infez. Med.*, 2020, Vol. 28, no. 2, pp. 174-184.

52. Rokni M., Ghasemi V., Tavakoli Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: Comparison with SARS and MERS. *Rev. Med. Virol.*, 2020, Vol. 30, no. 3, e2107. doi: 10.1002/RMV.2107.

53. Sariol S., Perlman S. Lessons for COVID-19 Immunity from other coronavirus infections. *Immunity*, 2020, Vol. 53, no. 2, pp. 248-263.

54. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.-B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E., Rooyackers O., Eriksson L.I., Sönnernborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K.,

Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.-G., Aleman S., Molinska B. COVID-19 study group, robust T cell immunity in convalescent indivi. Kar duals with asymptomatic or mild COVID-19. bioRxiv 2020.06.29.174888. Preprint, 2020. doi: 10.1101/2020.06.29.174888.

55. Shah V.K., Fimal P., Alam A., Ganguly D., Chattopadhyay S. Overview of immune response during SARS-CoV-2 infection: Lessons From the Past. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1949. doi: 10.3389/FIMMU.2020.01949.

56. Shin H.-S., Kim Y., Kim G., Lee J.Y., Jeong I., Joh J.-S., Kim H., Chang E., Sim S.Y., Park J.-S., Lim D.G. Immune responses to Middle East Respiratory Syndrome coronavirus during the acute and convalescent phases of human infection. *Clin. Infect. Dis.*, 2019, Vol. 68, pp. 984-992.

57. Tang F., Quan Y., Xin Z.T., Wrammert J., Ma M.J., Lv H., Wang T.B., Yang H., Richardus J.H., Liu W., Cao W.C. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with Severe Acute Respiratory Syndrome: a six-year follow-up study. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, pp. 7264-7268.

58. Thiel V., Weber F. Interferon and cytokine responses to SARS-coronavirus infection. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2008, Vol. 19, no. 2, pp. 121-132.

59. Thieme C.J., Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F., Hoelzer B., Konik M.J., Brenner T., Tempfer C., Watzl C., Dolff S., Dittmer U., Westhoff T.H., Witzke O., Stervbo U., Roch T., Babel N. The SARS-CoV-2 T-cell immunity is directed against the spike, membrane, and nucleocapsid protein and associated with COVID 19 severity. medRxiv 2020.05.13.20100636. Preprint, 2020. doi: 10.1101/2020.05.13.20100636.

60. Ulrich H., Pillat M. CD147 as a target for COVID-19 treatment: suggested effects of azithromycin and stem cell engagement. *Stem. Cell Rev. Rep.*, 2020, Vol. 16, no. 3, pp. 434-440.

61. Vaninov N. In the eye of the COVID-19 cytokine storm. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 5, 277. doi: 10.1038/S41577-020-0305-6.

62. Wan S., Yi Q., Fan S., Lv J., Zhang X., Guo L., Lang C., Xiao Q., Xiao K., Yi Z., Qiang M., Xiang J., Zhang B., Chen Y., Gao C. Relationships among lymphocyte subsets, cytokines, and the pulmonary inflammation index in coronavirus (COVID-19) infected patients. *Br. J. Haematol.*, 2020, Vol. 189, no. 3, pp. 428-437.

63. Wang K., Chen W., Zhou Y.S., Lian J.-Q., Zhang Z., Du P., Gong L., Zhang Y., Cui H.Y., Geng J.-J., Wang B., Sun X.-X., Wang C.-F., Yang X., Lin P., Deng Y.-Q., Wei D., Yang X.-M., Zhu Y.-M., Zhang K., Zheng Z.-H., Miao J. L., Guo T., Shi Y., Zhang J., Fu L., Wang Q.-Y., Bian H., Zhu P., Chenet Z.-N. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. BioRxiv preprint, 2020. doi: 10.1101/2020.03.14.988345.

64. Wang S.F., Chen K.H., Chen M., Li W.Y., Chen Y.J., Tsao C.H., Yen M.-Y., C Huang J., Chen Y.-M. A.Human-leukocyte antigen class I Cw 1502 and Class II DR 0301 genotypes are associated with resistance to Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) infection. *Viral Immunol.*, 2011, Vol. 24, pp. 421-426

65. Wang Y.D., Sin W.Y., Xu G.B., Yang H.H., Wong T.Y., Pang X.W., He X.Y., Zhang H.G., Ng J.N., Cheng C.S., Yu J., Meng L., Yang R.F., Lai S.T., Guo Z.H., Xie Y., Chen W.F. T-cell epitopes in Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) coronavirus spike protein elicit a specific T-cell immune response in patients who recover from SARS. *J. Virol.*, 2004, Vol. 78, no. 11, pp. 5612-5618.

66. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 — 11 March 2020. Available at: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.

67. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 2020, Vol. 367, pp. 1260-1263.

68. Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y. Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 2020, Vol. 367, no. 6485, pp. 1444-1448.

69. Yang L.T., Peng H., Zhu Z.L., Li G., Huang Z.T., Zhao Z.X., Koup R.A., Bailer R.T., Wu C.Y. Long-lived effector/central memory T-cell responses to Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus (SARS-CoV) S antigen in recovered SARS patients. *Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 120, no. 2, pp. 171-178.

70. Yang Y., Xiong Z., Zhang S., Yan Y., Nguyen J., Ng B., Lu H., Brendese J., Yang F., Wang H., Yang X.F. Bcl - xL inhibits T-cell apoptosis induced by expression of SARS coronavirus E protein in the absence of growth factors. *Biochem. J.*, 2005, Vol. 392, no. 1, pp. 135-143.

71. Yaqinuddin A. Cross-immunity between respiratory coronaviruses may limit COVID-19 fatalities. *Med. Hypotheses*, 2020, Vol. 144, 110049. doi: 10.1016/J.MEHY.2020.110049.

72. Yuan X., Huang W., Ye B., Chen C., Huang R., Wu F., Wei Q., Zhang W., Hu J. Changes of hematological and immunological parameters in COVID-19 patients. *Int. J. Hematol.*, 2020, Vol. 112, no. 4, pp 553-559.

73. Zhao J., Zhao J., Perlman S. T cell responses are required for protection from clinical disease and for virus clearance in Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus-infected mice. *J. Virol.*, 2010, Vol. 84, pp. 9318-9325

74. Zhao J., Li K., Wohlford-Lenane C., Agnihothram S.S., Fett C., Zhao J., Gale M.J. Jr., Baric R.S., Enjuanes L., Gallagher T., McCray P.B., Perlman S. Rapid generation of a mouse model for Middle East Respiratory Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2014, Vol. 111, no. 13, pp. 4970-4975.

75. Zhao J., Zhao J., Mangalam A.K., Channappanavar R., Fett C., D.K., Agnihothram S., Baric R.S., David C.S., Perlman S. Airway memory CD4⁺T cells mediate protective immunity against emerging respiratory coronaviruses. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 6, pp. 1379-1391.

76. Zhao J., Alshukairi A.N., Baharoon S.A., Ahmed W.A., Bokhari A.A., Nehdi A.M., Layqah L.A., Alghamdi M.G., Al Gethamy M.M., Dada A.M., Khalid I., Boujelal M., Al Johani S.M., Vogel L., Subbarao K., Mangalam A., Wu C., Ten Eyck P., Perlman S., Zhao J. Recovery from the Middle East Respiratory Syndrome is associated with antibody and T-cell responses. *Sci. Immunol.*, 2017, Vol. 2, eaan5393. doi: 10.1126/SCIIMMUNOL.AAN5393.

77. Zheng M., Gao Y., Wang G., Song G., Liu S., Sun D., Xu Y., Tian Z. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 5, pp. 533-535.

78. Zhu Z., Lian X., Su X., Wu W., Marraro G.A., From Z.Y. SARS and MERS to COVID-19: a brief summary and comparison of severe acute respiratory infections caused by three highly pathogenic human coronaviruses. *Respir. Res.*, 2020, Vol. 21, 224. doi: 10.1186/S12931-020-01479-W.

Авторы:

Иванова И.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, врио заведующего лабораторией иммунологии особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Омельченко Н.Д. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Филиппенко А.В. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Труфанова А.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Носков А.К. — директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Ivanova I.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Acting Head, Laboratory of Immunology of Specially Dangerous Infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Omelchenko N.D., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology of Specially Dangerous Infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Filippenko A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology of Specially Dangerous Infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Trufanova A.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology of Specially Dangerous Infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Noskov A.K., Director, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 17.03.2021

Отправлена на доработку 20.05.2021

Принята к печати 12.08.2021

Received 17.03.2021

Revision received 20.05.2021

Accepted 12.08.2021

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ИНФИЛЬТРАТА ПРИ ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Саидов М.З.

ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет», г. Махачкала, Республика Дагестан, Россия

Резюме. Клеточный инфильтрат является морфологическим субстратом иммуновоспалительных ревматических заболеваний. Системная прогрессирующая дезорганизация рыхлой волокнистой соединительной ткани сопровождается утратой толерантности с собственными аутоантигенами, активацией клеток макрофагально-моноцитарного ряда и аутореактивных клонов Т- и В-лимфоцитов. Гиперпродукция провоспалительных хемо- и цитокинов, локальные адгезионные лиганд-рецепторные взаимодействия, эндотелиальная реакция и ангиогенез способствуют формированию клеточного инфильтрата, эктопических лимфоидных структур и ГЗТ-гранул *in situ*. Аутоиммунный ответ является следствием последовательных системных и местных молекулярно-клеточных событий, в которых задействованы механизмы врожденного и адаптивного иммунитета. При интерпретации иммунопатогенеза ревматических заболеваний применяются все модели и схемы, принятые в области фундаментальной иммунологии. Это модель МНС-рестрикции, модель молекулярной мимикрии, или перекрестной (кросс) АГ-презентации, модель срыва центральной или периферической толерантности к ауто-АГ, модель кандидатных «триггеров» аутоиммунных и аутовоспалительных процессов, модель ассоциаций аллелей МНС I и II классов с конкретными, нозологически уникальными, ревматическими заболеваниями.

Ключевые слова: воспаление, ревматические болезни, макрофаги, лимфоциты, цитокины, хемокины, ангиогенез, гранулы, МНС I класса, МНС II класса

PATHOGENETIC VALUE OF CELL INFILTRATE IN IMMUNOINFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES

Saidov M.Z.

Dagestan State Medical University, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russian Federation

Abstract. Cell infiltrate is a morphological substrate of immunoinflammatory rheumatic diseases. The systemic wide progressive disorganization of loose fibrous connective tissue is accompanied by the loss of

Адрес для переписки:

Саидов Марат Зиявдинович
ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный
медицинский университет»
367000, Россия, Республика Дагестан,
г. Махачкала, пл. Ленина, 1.
Тел.: 8 (988) 300-90-45.
E-mail: marat.saidov.55@mail.ru

Address for correspondence:

Saidov Marat Z.
Dagestan State Medical University
367000, Russian Federation, Republic of Dagestan,
Makhachkala, Lenin sq., 1.
Phone: 7 (988) 300-90-45.
E-mail: marat.saidov.55@mail.ru

Образец цитирования:

М.З. Саидов «Патогенетическое значение клеточного инфильтрата при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1239-1270.
doi: 10.15789/1563-0625-PVO-2386
© Саидов М.З., 2021

For citation:

M.Z. Saidov "Pathogenetic value of cell infiltrate in immunoinflammatory rheumatic diseases", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1239-1270.
doi: 10.15789/1563-0625-PVO-2386
DOI: 10.15789/1563-0625-PVO-2386

tolerance with its own autoantigenes, activation of macrophagal-monocyte cells and autoreactive clones of T and B lymphocytes. Hyperproduction of pro-inflammatory chemokines and cytokines, local adhesive ligand-receptor interactions, endothelial reaction and angiogenesis contribute to the formation of cell infiltrate, ectopic lymphoid structures and GZT-granulomas *in situ*. The autoimmune response is the result of successive systemic and local molecular cellular events in which the mechanisms of congenital and adaptive immunity are involved. When interpreting immunopathogenesis of rheumatic diseases, all models and schemes adopted in the field of fundamental immunology are used. This is a model of MHC-restrictions, a model of molecular mimicry, or cross of the antigen presentation, a model of disrupting central or peripheral tolerance to auto-antigens, a model of candidate “triggers” of autoimmune and autoinflammatory processes, a model of associations of alleles MHC I and II classes with specific, nosologically unique, rheumatic diseases.

Keywords: inflammation, rheumatic diseases, macrophages, lymphocytes, cytokines, chemokines, angiogenesis, MHC I class, MHC II class

Введение

Более чем двухтысячелетняя история изучения воспаления являет собой пример того, что углубление наших знаний об этом наиболее широко распространенном общепатологическом (типовом) процессе связано с постоянно обновляющимися теоретическими представлениями о патофизиологической сущности этой реакции. В процессе биологической эволюции сформировались уникальные качества воспаления, при которых течение и исход этого патологического процесса зависит от функциональных свойств всех гомеостатических систем организма, прежде всего, иммунной, эндокринной и нервной.

Воспаление представляет собой сосудисто-мезенхимную реакцию на повреждение, направленную на локализацию, инактивацию и ликвидацию флогенов, а также на репарацию клеток и тканей организма. При ревматических заболеваниях неотъемлемым компонентом этих процессов является участие иммунной системы. По И.И. Мечникову, «воспаление является важнейшим проявлением иммунитета организма» [7].

Однако это участие имеет уникальные черты. Реализация основного предназначения иммунной системы, а именно — сохранения структурно-функциональной целостности внутренней среды организма, при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях (ИВРЗ) приобретает характеристики аутоиммунного ответа на продукты дезорганизации рыхлой волокнистой соединительной ткани со всеми вытекающими из этого последствиями.

В целом взаимоотношения и взаимовлияния воспаления и реакций гиперчувствительности, аутоиммунитета, иммунодефицитных состояний остаются предметом исследований и неослабевающих дискуссий. Совершенно очевидна и практическая значимость указанных проблем.

Индукция иммунного ответа (как врожденного, так и адаптивного) является следствием функциональной активации воспалительных клеток мезенхимного гистогенеза. Отсюда и положение, ставшее аксиомой: иммунологический гомеостаз есть гомеостаз структурный [3].

Кардинальными признаками воспаления являются формирование под воздействием флогенов зон первичной и вторичной альтерации, реакций микроциркуляторного русла, выхода жидкой части крови, биоорганических соединений, электролитов из сосудов в ткани — экссудации, скопление эмигрирующих клеток гематогенного происхождения и активация резидентных клеток *in situ* и исход указанных патологических процессов в виде развития склероза и фиброза или разрешения процесса с полной или неполной регенерацией клеток и тканей. При ревматических заболеваниях все указанные процессы могут находиться на разных стадиях своего развития и эта «разностадийность» обуславливает патоморфологическую картину воспаления на светооптическом уровне.

Эволюционная древность, широкая распространенность, этиологическая и патогенетическая гетерогенность, полиморфизм клинической картины обуславливают выделение различных видов воспаления. Один из них — это хроническое продуктивное воспаление (ХПВ). Исходя из общей схемы воспалительного процесса, ХПВ является третьей стадией воспаления, начинающейся уже на фоне экссудации и эмиграции клеток гематогенного происхождения и характеризующейся ключевым признаком — формированием клеточного воспалительного инфильтрата (КВИ). КВИ является важнейшим патогенетическим звеном при ИВРЗ. Состав инфильтрата формируется из клеток гематогенного происхождения и активированных резидентных клеток *in situ*. К ним принадлежат клетки макрофагаль-

но-моноцитарного гистогенеза (оседлые Мф, моноциты крови), дендритные клетки (плазмитоидные ДК, миелоидные ДК, клетки Лангерганса), Т-лимфоциты, В-лимфоциты, нейтрофилы и эозинофилы крови, фибробласты, тучные клетки. Активация этих клеток, продукция и рецепция ими спектра провоспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-8, TNF α , TNF β , IFN α , IFN β , IFN γ и др.), группы провоспалительных хемокинов (СХС-хемокины (CXCL1 – CXCL8), СС-хемокины (CCL1 – CCL16), IL-8 и др., факторов ангиогенеза (ангиогенные ростовые факторы – VEGF-A, ангиопоэтины 1 и 2, TGF- β), фактора роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарного ростового фактора (PDGFR α), а также все типы коллагенов, фибронектин и др. являются движущей силой формирования КВИ [91].

Плацдармом ИВРЗ является рыхлая волокнистая неоформленная соединительная ткань. В понимании патогенетической значимости этой ткани при воспалении заметное место отводится работам А.А. Богомольца, в которых он предложил объединить все клетки мезенхимного гистогенеза, способные к фагоцитозу, межклеточной кооперации и имеющие определенную гомеостатическую автономию в «физиологическую систему соединительной ткани» [2]. Другие названия этой системы – «ретикуло-эндотелиальная система» по К.А. Ашоффу, «активная мезенхима» по М. Яффе, «макрофагально-эндотелиальная система», «система мононуклеарных фагоцитов» [1].

Необходимо отметить, что впервые научное обоснование роли «активной мезенхимы» в воспалительных процессах с позиций общей патологии представил основоположник клеточной иммунологии и автор фагоцитарной теории воспаления И.И. Мечников [7].

Важным физиологическим элементом гомеостаза этой ткани являются межклеточные и коллаген-клеточные взаимодействия. Речь идет о клетках-продуцентах всех типов коллагена, эластина и других компонентах матрикса соединительной ткани, о взаимодействии между разными типами мезенхимных клеток и, как следствие, регуляции стромально-паренхиматозных соотношений, осуществляемых посредством сети хемо- и цитокинов. Хорошо документированы, в том числе электронно-микроскопически, макрофагально-лимфоцитарные, макрофагально-нейтрофильные, лимфоцитарно-нейтрофильные, макрофагально-фибробластические, нейтрофильно-фибробластические межклеточные контакты, также отмечено взаимодействие тучных

клеток и эозинофилов с сосудистыми элементами, прежде всего, с эндотелиоцитами и все это происходит в основном в веществе рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани. В подобных межклеточных контактах и соответствующих функциональных следствиях проявляется сопряжение воспаления, регенерации и фиброза [6, 12].

Гистогенетическая гетерогенность КВИ, множественность межклеточных контактов, активное влияние на воспалительный процесс основного вещества и волокнистых структур соединительной ткани, функциональная разнонаправленность активированного состояния каждого типа клеток в составе КВИ и, соответственно, разные патофизиологические следствия для организма в целом, подчеркивают многокомпонентность, полисистемность, полисиндромность и этапность ХПВ. Защитно-репаративная сторона ХПВ есть, по сути, функция системы иммунитета. Наличие практически всех клеток иммунной системы в очаге воспаления, их активированное состояние, межклеточные контакты, секреция и рецепция цитокинов, хемокинов являются свидетельством иммунопатогенеза заболеваний, при которых патоморфологически идентифицируется КВИ.

Уникальность реактивности рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани состоит в том, что воздействие различных флогенов сопровождается однотипной реакцией этой ткани, в каких бы органах она ни располагалась. На основании патоморфологической верификации фибриноидных изменений основного вещества соединительной ткани при различных нозологиях американский патолог Р. Klempereг в 1950 г. предложил объединить их в группу болезней коллагена, или коллагенозов, а поражение соединительной ткани отнести за счет состояния гиперчувствительности иммунной системы организма [81]. Последующие многочисленные работы подтвердили патогенетическую обоснованность подобного объединения и доминирующее значение иммунного воспаления как в *locus morbi*, так и при системных проявлениях.

Наиболее обоснованную, подкрепленную собственными наблюдениями, схему патоморфологических изменений при иммуновоспалительных (коллагеновых) болезнях представили А.И. Струков и А.Г. Берларян [13]. В соответствии с таким подходом общим признаком коллагеновых болезней является системная прогрессирующая дезорганизация рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани с обязательным вовлечением в патологический процесс стенок

сосудов. В настоящее время эти процессы определяются как ремоделирование соединительной ткани. В целом ремоделирование соединительной ткани является интегративным процессом, в который вовлекаются функциональная активность клеток воспалительного инфильтрата, процессы фиброгенеза, неоангиогенеза, дезорганизации внеклеточного матрикса, заживления ран, опухолевого роста [41, 70].

Патоморфологически наиболее ранним признаком дезорганизации соединительной ткани является мукоидное набухание (слизистый отек) основного вещества соединительной ткани вследствие накопления и перераспределения гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов А, В, С, гепарина и др. с признаками разволокнения коллагенового каркаса, повышения гидрофильности ткани и сосудистой проницаемости. При продолжающемся воздействии триггеров патологического процесса очаги дезорганизации обогащаются белками плазмы крови, в том числе фибриногеном, и, в совокупности, указанные биоорганические соединения обуславливают приобретение тканью тинкториальных свойств фибрина. Эта фаза определяется как фаза фибриноидных изменений. Гистохимические исследования биопсийного и операционного материалов дали основания для выделения следующих разновидностей фибриноидных изменений — фибриноид без фибрина, фибриноид с фибрином и фибриноидный некроз. Эта фаза является необратимой и на фоне проявлений дистрофических, некробиотических и некротических изменений соединительной ткани весьма вероятно появление антигенных детерминант, индуцирующих аутоиммунный ответ. Свидетельством подобного взгляда является обязательное присутствие следующей фазы — фазы клеточных реакций, которые можно интерпретировать в том числе и как организацию аутоиммунного ответа на ауто-АГ [126].

Эта фаза носит характер диффузных или очаговых мононуклеарно-клеточных инфильтратов и формирования гранулем различной степени зрелости, которые могут носить гигантоклеточный характер. Гранулемы формируются, начиная с этапа фибриноидных изменений, и характеризуются накоплением активированных макрофагов и веерообразным расположением этих клеток вокруг масс фибриноида и фагоцитозом продуктов дезорганизации основного вещества соединительной ткани. Наиболее явственно описанная картина встречается при ревматической лихорадке, но базисные характеристики представлены в

той или иной мере и форме при всех других ревматических заболеваниях. Патоморфологическая идентификация гранулем при ревматических заболеваниях является свидетельством участия гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) как клеточного типа иммуновоспалительных реакций. Фаза клеточных реакций является фазой реализации иммунопатогенетического аспекта ревматических заболеваний. На светоптическом уровне эта фаза выражается в виде макрофагальной реакции, фагоцитозе клеточного и тканевого детрита, с последующей презентацией антигенного материала лимфоцитам (функции АПК), атрофии лимфоидной ткани с замещением лимфоидных элементов плазматическими клетками (плазматизация лимфоидной ткани), миелоидной метаплазии центров размножения фолликулов лимфатических узлов и селезенки, формированием фолликулоподобных структур, периваскулярной инфильтрации мононуклеарами (лимфоциты, моноциты), что формирует хронический продуктивный панваскулит.

Завершающий этап указанных изменений — развитие процессов фиброза и склероза, при которых ключевое значение приобретает активность фибробластов. Важной характеристикой этого процесса является сочетание сформировавшихся очагов фиброза и склероза с признаками мукоидного набухания и фибриноидных изменений, что свидетельствует о непрерывном, прогрессирующем течении заболевания. Необходимо подчеркнуть, что все изменения, возникающие при коллагенозах в полной мере относятся и к стенкам сосудов, что обуславливает формирование васкулитов. Описанные процессы свойственны таким хроническим системным иммуновоспалительным ревматическим заболеваниям, как ревматическая лихорадка (РЛ), ревматоидный артрит (РА), системная красная волчанка (СКВ), системная склеродермия (ССД), дермато-полимиозиты (ПМ), системные васкулиты (СВ).

Какие же молекулярно-клеточные процессы лежат в основе формирования иммуновоспалительного клеточного инфильтрата при ИВРЗ?

Клеточный инфильтрат при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

Морфологическим субстратом ХПВ является КВИ. С позиций общей патологии в формировании КВИ при ИВРЗ ключевая роль принадлежит состоянию гиперреактивности системы соединительной ткани. Еще И.В. Давыдовский писал: «гиперергические реакции различной сложности наблюдаются часто и в процессе «аутоиммуни-

зации» и далее «таким образом, воспалительный процесс в принципе является иммунизаторным» [4]. В ситуации иммуновоспалительного процесса при ревматических заболеваниях гомеостатическая регуляция матрикс-клеточных взаимодействий существенно нарушается. Формируются сложные каскады межклеточных взаимодействий, из которых наиболее патогенетически значимые — это триада: макрофаг-лимфоцит-фибробласт, в которой связующим элементом являются макрофаги (Мф). Мф и гистогенетически близким им клеткам отводится центральная роль в формировании КВИ. Эта роль обусловлена тем, что эволюционно выработанная основная функциональная предназначение Мф, а именно — утилизация отжившего клеточного и тканевого детрита, а также индукция адаптивного АГ-специфического иммунного ответа, в контексте ИВРЗ, трансформируется в презентацию ауто-АГ CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитам и аутоиммунным ответом на продукты дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани [97]. Накопление Мф в очаге воспаления является признаком разгара этого патологического процесса.

КВИ является динамической структурой, отражающей этапность, рецидивирующее течение и исход ИВРЗ. КВИ может принимать организованные и неорганизованные формы. К первым относятся фолликулоподобные структуры и ГЗТ-гранулемы, ко вторым — диффузный клеточный воспалительный инфильтрат. Исход указанных форм КВИ может быть в виде его исчезновения; в виде образования рубца вследствие несбалансированного фиброза; в виде обострения воспаления *in situ* за счет притока лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов и других клеток; в виде персистенции воспаления.

В процессах несбалансированного фиброза видное участие принимают активированные Мф. Участие этих клеток выражается в том, что продукция ими фибронектина усиливают аттракцию фибробластов в зоне воспаления и стимулируют их коллагенсинтетическую активность. Кроме этого, важными факторами активации и пролиферации фибробластов является фактор роста фибробластов 2 (FGF2) и тромбоцитарные факторы роста (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C и PDGF-D) [40]. Под влиянием этих и других факторов микроокружения фибробласты могут нарабатывать коллаген, но также способны секретировать и коллагеназу, вызывающую деградацию основного вещества соединительной ткани, т.е. имеет место сочетание явлений фиброгенеза и

фиброклазии, обуславливающих несбалансированный фиброз. Отметим роль макрофагальных ферментов. Протеазы макрофагов способны расщеплять любые белковые компоненты матрикса соединительной ткани, влияя на аутоантигенность последних. Однако в зонах прогрессирующего фиброза количество макрофагов, продуцирующих коллагеназу, существенно уменьшается.

Воздействие кандидатных триггеров иммуновоспалительных процессов приводят к первоначальным признакам дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, связанной с деполимеризацией основного вещества соединительной ткани (протеогликаны), разволокнением коллагенового каркаса, под воздействием в том числе коллагеназ, эластаз и гиалуронидаз, что сопровождается явлением метахромазии, повышением гидрофильности ткани и мукоидным набуханием, повышением сосудистой проницаемости и развитием воспалительного отека. Нарушение структуры коллагеновых и эластических волокон, увеличение уровня фибронектина, продукция провоспалительных хемокинов и факторов роста эндотелиоцитов способствуют усилению воспаления и ангиогенеза [145].

Патоморфология диффузного КВИ на светоптическом уровне при всех ИВРЗ характеризуется определенной унифицированностью клеточного состава. Воспалительный инфильтрат является преимущественно мононуклеарным. В количественном отношении доминирующими клетками в составе КВИ являются лимфоциты, затем идут клетки макрофагально-моноцитарного ряда.

На рисунке 1 (см. 2-ю стр. обложки) представлена общая типичная картина ХПВ при СКВ и при ПМ. Видно, что инфильтрат и при СКВ в дерме, и в поперечнополосатых мышцах при ПМ располагается компактно, довольно выраженный и является мононуклеарным.

Организованная форма инфильтрата в виде гранулемы, или узелка, представлена на рисунке 2 слева (см. 2-ю стр. обложки). В данном случае определяется гранулема в миокарде при РЛ. Видно, что и в этом случае инфильтрат является мононуклеарным, компактным, морфологически идентифицируемым как узелок. Всем ИВРЗ характерно развитие продуктивного васкулита той или иной степени выраженности с периваскулярной локализацией КВИ. На рисунке 2 справа (см. 2-ю стр. обложки) представлена картина мононуклеарной инфильтрации при узелковом полиартериите. Важной особенностью этого препарата

является наличие периваскулярного фибриноидного некроза. Но это явление определяется не всегда. На рисунке 3 (см. 2-ю стр. обложки) справа представлена картина продуктивного васкулита с активным периваскулярным инфильтратом, но без признаков некроза. Одновременное присутствие признаков некроза с последующей организацией этих зон в склеротические и активного мононуклеарного инфильтрата свидетельствует о рецидивирующем характере воспаления при ИВРЗ.

Первыми клетками, реагирующими на воздействие кандидатных триггеров ИВРЗ, являются клетки макрофагально-моноцитарного ряда, дендритные клетки (ДК) и активированные эндотелиоциты. Фагоцитарная активность этих клеток по отношению в том числе к продуктам дезорганизации соединительной ткани является базисной в отношении индукции межклеточной кооперации по типу «фагоциты-лимфоциты» и формирования микроокружения, оптимального для индукции аутоиммунных процессов *in situ*. Фагоцитоз Мф указанных продуктов, а также материала аутологичных клеток, подвергшихся некробиозу и некрозу *in situ*, ограниченный протеолиз фагоцитированного материала обеспечивает включение клеточно-молекулярного механизма антигенной презентации Т-лимфоцитам, в избытке находящихся в составе воспалительного инфильтрата. В очаге ХПВ идут интенсивные процессы неоангиогенеза. Не исключается, что активированные эндотелиоциты могут приобретать в том числе и АГ-презентирующие свойства.

В этих условиях наблюдается известный патоморфологический признак аутоиммунных процессов — плазматизация лимфоидной ткани. В-лимфоциты подвергаются дальнейшему созреванию и превращению в плазматические клетки (CD38⁺) — продуценты ауто-АТ. Одновременно, активированные В-лимфоциты, находящиеся в микроокружении продуктивного воспаления, могут выполнять функции АГ-презентирующих клеток (АПК), внося тем самым свой вклад в прогрессирование аутоиммунного процесса.

Важным является феномен эктопической экспрессии молекул МНС I и II класса на Мф и ДК при ИВРЗ, индуцирующих презентацию ауто-АГ аутоспецифическим клонам Т-лимфоцитов и последующее развитие аутоиммунного ответа [77].

В составе КВИ иммуногистохимически идентифицируются Т-лимфоциты (CD3⁺), Т-фолликулярные хелперные клетки (Tfh CD4⁺ клетки), Т-цитотоксические клетки (CD8⁺), В-лимфоциты (CD20⁺), плазматические клетки

(CD38⁺), макрофаги (CD68⁺), фолликулярные дендритные клетки (ФДК), в меньшем количестве, нейтрофилы (Нф), эозинофилы, тучные клетки [42, 87, 89]. Согласно нашим данным с составе КВИ при ревматоидных синовиитах и при дерматомиозите иммуногистохимически идентифицируются преимущественно Т-клетки (CD3⁺, CD4⁺), В-клетки (CD20⁺), макрофаги (CD68⁺). Также отмечалась тенденция к периваскулярной локализации КВИ и высокий уровень экспрессии ингибитора апоптоза — онкопротеина bcl-2 и маркера ангиогенеза — CD31 [10, 11]. Субпопуляционный состав КВИ имеет дифференциально-диагностическое значение. Так, при полимиозите CD8⁺Т-клетки являются преобладающими в КВИ, тогда как CD4⁺Т-клетки преимущественно проникают в мышечные волокна при дерматомиозите [98].

Необходимо отметить, что активированные мононуклеары непосредственно влияют на активность фибробластов. Эти клетки способны не только стимулировать функции фибробластов (участников КВИ), но и тормозить их, выступая в качестве истинных регуляторов фиброгенеза *in situ*. Так, IFN γ , продуцируемый Th1 CD4⁺ лимфоцитами, макрофагальный IFN β , а также TNF α , способны тормозить коллаген-синтетическую функцию фибробластов [52, 170]. Фенотип клеток в составе КВИ коррелирует с эффективностью лечения, что показано, в частности, при РА [48].

Резидентные Мф, а также Мф, трансформировавшиеся из моноцитов гематогенного происхождения, гетерогенны и разделяются на две субпопуляции — M1 и M2. M1 макрофаги, экспрессирующие мембранные маркеры CD215, CD80 и CD86, являются активными участниками воспаления, продуцируя провоспалительные и другие цитокины (TNF α , TNF β , IL-6, IL-1 β , CCL2, IL-8, IL-12, IL-23, IFN I типа, GM-CSF), способствуют прогрессированию этого процесса, в то время как M2 макрофаги, имеющие фенотип CD206, CD209, продуцируют противовоспалительные цитокины (TNF β , IL-10, IL-4, IL-13), обладают противовоспалительными эффектами и вносят свой вклад в процессы ремоделирования соединительной ткани и репаративной регенерации. Возможны взаимные переходы этих клеток. Поляризация M1/M2 зависит от хемо- и цитокинового окружения и наличия рецепторов к ним [99, 166].

Прямое участие клеток макрофагально-моноцитарного ряда в индукции аутоиммунного ответа продемонстрировано при СКВ. Показано,

что моноциты гематогенного происхождения в составе КВИ способны дифференцироваться в плазматоидные дендритные клетки (пДК), экспрессирующие высокий уровень CD86 и продуцирующие IFN α . Такого рода пДК способны активно презентировать ауто-АГ аутореактивным Т-клеткам [25, 47].

Важный вклад в индукцию аутоиммунного ответа вносит так называемый «дефектный» фагоцитоз, при котором фагоцитированный материал может служить источником ауто-АГ. Основное предназначение фагоцитарной активности – утилизация клеточного и тканевого детрита – при ИВРЗ приобретает новые качественные особенности, трансформирующие АГ-презентирующую функцию Мф в направлении аутоиммунизации. Эти процессы документированы, в частности при СКВ [65].

Неэффективное очищение макрофагами места воспаления от фрагментов клеток, подвергшихся апоптозу, также может служить триггером аутоиммунных процессов. При этом количество Мф (CD68⁺) в составе КВИ может существенно превышать нормативные показатели, что показано при системной склеродермии [66, 97]. Важно, что при этом заболевании М2 макрофаги способствуют активации резидентных фибробластов и прогрессии фиброза за счет продукции трансформирующего фактора роста β (TGF- β), фактора роста эндотелиоцитов (VEGF) и тромбоцитарного ростового фактора (PDGF) [29].

«Дефектный» фагоцитоз показан и при синдроме Шегрена. При этом синдроме фагоцитоз клеток, подвергшихся апоптозу, сопровождается индукцией аутоиммунного ответа, увеличением уровня провоспалительных цитокинов (IL-6, IFN γ , TNF α , IL-1 β), IL-18, хемокинов (CXCL8, CXCL10), VEGF и PDGF [64].

Инфильтрация Мф синовиальной оболочки является одним из важных признаков РА. Патогенетическое значение активированных Мф в составе КВИ при РА определяется способностью этих клеток продуцировать избыточное количество провоспалительных цитокинов, из них ключевой – это TNF α , а также IL-1, IL-6 и IL-12. Иммуногистохимическими методами показано присутствие этих цитокинов в синовии при РА и определена корреляция воспалительного процесса с их уровнем *in situ* [171].

Активация Мф связана с экспрессией поверхностной молекулы CD40, имеющей свойства рецептора. Взаимодействие CD40 с растворимыми и мембран-ассоциированными молекулами CD154 индуцирует продукцию Мф ряда металло-

протеиназ (MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-11, MMP-12), а также IFN γ -индуцированную продукцию оксида азота. Молекулы CD154, принадлежащие к семейству TNF, в комбинации с IFN γ могут вызвать переход М2 Мф в М1 Мф. Таким образом, взаимодействие CD40/CD154 способствует прогрессированию продуктивного воспаления. Источником CD154 являются активированные CD4⁺ клетки, фибробласты и тромбоциты [105, 169].

Активированные макрофаги/моноциты продуцируют хемокины (СС-хемокины), IL-8, моноцитарный хемоаттрактант (MCP-1), макрофагальный воспалительный протеин (MIP-1 α), провоспалительные цитокины – IL-1, IL-6, TNF α и иммунорегуляторные цитокины – IL-10, IL-12. Эти растворимые факторы являются патогенетически важными при ХПВ [130].

Представленный спектр растворимых макрофагальных факторов, их специфичность и многофункциональность позволяет привлечь в место формирования КВИ лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и модулировать их активность в соответствии с конкретными условиями микроокружения. Эффекторные Th1 CD4⁺ лимфоциты мигрируют в очаг воспаления и, продуцируя IFN γ , IL-2, TNF α , обеспечивают развитие ГЗТ. На этом этапе возможно взаимодействие этих клеток с макрофагами, фагоцитировавшими продукты дезорганизации основного вещества соединительной ткани. Это взаимодействие опосредуется через молекулу CD40 на поверхности макрофага, а также с участием IFN γ .

Клетки в составе КВИ могут подвергаться некротическим и некробиотическим изменениям. Подобное повреждение клеток сопровождается появлением эндогенных сигналов опасности, называемых аларминами, или DAMP, активирующих фолликулярные дендритные клетки (фДК) и плазматоидные дендритные клетки (пДК). DAMP способны взаимодействовать с рецепторами врожденного иммунитета (TLR-2, TLR-4, TLR-7, TLR-9) на ДК и активировать их. Роль ДК в активации адаптивного иммунитета, ведущего к выработке ауто-АТ, хорошо известна. В эктопических зародышевых центрах при ИВРЗ DAMP – активированные ДК, секретируя провоспалительный цитокиновый каскад, прежде всего IFN I типа, индуцируют процессы продуктивного воспаления, в том числе и иммунный ответ на ауто-АТ. Указанные явления определены при РА, при СКВ и при синдроме Шегрена в слюнных железах [125].

К числу наиболее актуальных эндогенных молекул-аларминов, имеющих несомненное патогенетическое значение при ИВРС, относится высокомолекулярный групповой белок 1, обозначаемый как HMGB1. HMGB1 является негистоновым ядерным белком, освобождающимся из клеток, подвергшихся инфекционному повреждению, некрозу, некробиозу, клеточному стрессу. Взаимодействуя с рецепторами врожденного иммунитета (TLR-2, TLR-4, TLR-7, TLR-9), экспрессирующихся на ДК и Мф, HMGB1 способствует продукции $IFN\alpha$, $IL-1\beta$, $TNF\alpha$ плазматическими ДК и Мф, тем самым способствуя прогрессированию продуктивного воспаления *in situ* и усилению АГ-презентирующей функции ДК и Мф. Кроме этого, имеются данные о том, что HMGB1 способен индуцировать анти-HMGB1-антитела, которые относят к общему классу анти-ядерных ауто-АТ при ревматических заболеваниях [120, 167].

Немаловажным свойством HMGB1 является также способность этого белка активировать тканевые металлопротеиназы (MMP1-9) и тканевой плазминоген, активность которых вносит существенный вклад в дезорганизацию рыхлой волокнистой соединительной ткани. Напомним, что к классу MMP принадлежат ферменты коллагеназы и эластазы. Указанные процессы документированы при СКВ [23], при РА [158], при синдроме Шегрена [51], при полимиозите [162].

На рисунке 3 (см. 2-ю стр. обложки) представлено фото экспрессии HMGB1 при коллаген-индуцированном артрите. Видно, что иммуногистохимически позитивная реакция на HMGB1 определяется на большинстве клеток в составе КВИ.

При интерпретации патогенетической значимости КВИ при ревматических заболеваниях в настоящее время внимание уделяется новому феномену, называемому «внеклеточными ловушками». Первоначально этот феномен был отнесен к сфере антиинфекционного иммунитета, впоследствии появились данные, не всегда однозначные, об участии «внеклеточных ловушек» в аутоиммунных процессах, в том числе и при ревматических заболеваниях — СКВ, РА, васкулитах [76, 83]. В случаях, когда этот процесс осуществляется клетками макрофагально-моноцитарного ряда «внеклеточные ловушки», обозначаются как «метозис». В случаях, когда этот процесс осуществляется Нф, он обозначается как «нетозис». Суть этого феномена сводится к уникальной серии внутриклеточных событий, посредством которых ядерное содержимое, включая хроматин, сме-

шивается с клеточными белками и затем вытесняется из клеток с образованием внеклеточных структур, способных «захватить» и убить микроорганизмы [32, 50].

Процессы нетозиса и метозиса относят к формам программируемой клеточной гибели. Первые публикации касательно нейтрофильных «внеклеточных ловушек» (NET) появились в 2004 году и за этим быстро последовало описание этого феномена и в отношении других клеток — макрофагов, моноцитов, эозинофилов, базофилов, тучных клеток. Поскольку процесс метозиса имеет некоторые черты сходства с фагоцитарным актом, то была предложена точка зрения, согласно которой при метозисе могут присутствовать процессы внутриклеточного ограниченного протеолиза, связанные с презентацией АГ детерминант. В пользу подобного взгляда выступают данные, свидетельствующие о цитрулинизации ДНК-связанных белков — гистонов в процессе нетозиса и приобретения ими ауто-АГ свойств, в частности при РА [79].

При СКВ функцию нетозиса берет на себя популяция гранулоцитов низкой плотности (LDG), которая отсутствует у здоровых людей. Процесс LDG-нетозиса при СКВ сопровождается появлением ауто-АГ детерминант, способствующих дальнейшему повреждению соединительной ткани, последующей активации пДК и гиперпродукции $IFN\ I$ типа. Также предполагается, что при СКВ нетозис является неким связывающим звеном между появлением аутоантител при дезорганизации основного вещества соединительной ткани и индукции процесса метозиса, осуществляемыми пДК и выработкой ауто-АТ против ДНК [35, 57].

Клеточные компоненты нетозиса могут активировать В-клетки через BCR-клеточный рецептор и TLR9 рецептор, с последующей продукцией аутоантител против ДНК и кателицидина LL-37 [92]. Показано, что активированные эндотелиоциты также способны прямо стимулировать Нф к нетозису, которые, пребывая в этом состоянии, могут уже сами вызвать повреждение эндотелия [61].

Как видно из представленных результатов исследований, формирование КВИ при ИВРС — это многокомпонентный процесс, направление развития которого зависит от степени и характера дезорганизации рыхлой волокнистой соединительной ткани, микроокружения, клеточного состава и функциональной активности КВИ, спектра продукции и рецепции провоспалительных цито- и хемокинов и других растворимых факто-

ров. Организация КВИ подвергается определенным закономерностям и характеризуется формированием морфологических форм, имеющих важное патогенетическое значение при ИВРЗ.

Эктопические лимфоидные структуры, или эктопический лимфоидный неогенез, при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

Уникальной особенностью исходов КВИ является возможность приобретения клеточным инфильтратом определенных структурированных форм, отражающих в определенной мере нозологическую специфичность ревматических заболеваний и потенциальную возможность индукции аутоиммунного ответа в *locus morbi*. Одновременно эти процессы сочетаются с разностадийностью хронического воспаления, когда в воспаленной ткани определяются признаки мукоидного набухания и фибриноидных изменений с явлениями склероза и фиброза. Морфологическая трансформация КВИ в структуры, напоминающие вторичные лимфоидные органы (лимфатические узлы, пейеровы бляшки, селезенка) получила название «эктопические лимфоидные структуры» (ELS) или «эктопический лимфоидный неогенез». ELS приобретают многие особенности лимфоидных фолликулов вторичных лимфоидных органов, включая компартментализацию зон, богатых Т-клетками и В-клетками, и накопление фолликулярных дендритных клеток (фДК). Наиболее ярко ELS представлены при ревматоидных синовиитах в виде фолликулоподобных структур в субсиновиальном слое [9].

На рисунке 4 (см. 2-ю стр. обложки) в качестве сравнительной иллюстрации представлены фото герминативного центра в интактной небной миндалине слева и герминативный центр фолликулоподобной структуры в синовиальной оболочке при РА справа. Видно, что в общей морфологической организации этих двух структур прослеживается значительная аналогия.

Клеточное микроокружение в ELS широкий спектр продуцируемых и рецептируемых клетками воспалительного инфильтрата провоспалительных цито- и хемокинов, создают оптимальные условия для индукции аутоиммунного ответа *in situ*. CD4⁺Т-лимфоциты, находящиеся в составе КВИ, являются ключевыми клетками в процессах активации В-лимфоцитов, их дифференцировки в плазматические клетки и продукции последними ауто-АТ. Этот факт отражает известный патоморфологический признак иммуновоспалительных ревматических заболеваний, а именно — плазматизация лимфоидной ткани. В условиях ELS функции Т-хелперных клеток

среди всей субпопуляции CD4⁺ клеток берут на себя фолликулярные Т-хелперные клетки (Tfh), несущие фенотип CD4⁺CXCR5⁺Bcl6⁺. Tfh-клетки продуцируют важный иммунорегуляторный фактор IL-21 и хемокин CXCL13. IL-21 — это цитокин, который способствует пролиферации В-клеток в зародышевых центрах (GC) и их дифференцировке в плазматические клетки. IL-21 могут продуцировать и активированные макрофаги в условиях ELS [146].

Продукция Tfh-клетками хемокина CXCL13 и его взаимодействие с хемокиновым рецептором CXCR5 на В-лимфоцитах способствует формированию агрегатов В-лимфоцитов, которые являются важной составляющей ELS. Выраженная экспрессия CXCR5 на В-лимфоцитах в составе воспалительного инфильтрата определяется при ревматоидных синовиитах. Это взаимодействие стимулирует В-лимфоциты к трансформации в плазматические клетки, продуцирующие ауто-АТ локально, в очаге продуктивного воспаления, в условиях ELS [30].

На рисунке 5 (см. 2-ю стр. обложки) представлены лимфоплазмоцитарные инфильтраты при ревматоидном синовите, принимающие формы фолликулоподобных структур и иммуногистохимическую идентификацию хемокина CXCL13 в этих структурах в синовиальной оболочке при РА в крайнем справа фото.

Фолликулоподобные структуры включают в себя макрофаги (CD68⁺), Т-лимфоциты (CD4⁺), В-лимфоциты (CD20⁺), дендритные клетки (CD303⁺). При РА в них определяются большие клеточные агрегаты, включающие скопления фДК, обладающих высокой АГ-презентирующей способностью [122].

На рисунке 6 (см. 2-ю стр. обложки) представлены фото фолликулоподобных структур в синовиальной оболочке при РА. Видно, что эктопические герминативные центры находятся на разных стадиях своего формирования и функционального состояния. Наличие очагов эктопического лимфоидного неогенеза с герминативными центрами позволяют выделить определенные патологические варианты РА [31].

Кроме того, со стадией развития указанных структур (начальные этапы, затем этапы с формированием герминативных центров) хорошо коррелируют с наличием сывороточного ревматоидного фактора (РФ), ревматоидных узелков и, особенно, с тяжестью эрозий суставного хряща. Лимфоидный неогенез при РА определялся в биопсийном материале в 31% случаев [160]. У пациентов с серопозитивным РА могут органи-

зовываться агрегаты Т-клеток в синовиальной ткани. Это часто мелкие или средние агрегаты, хотя у ~ 10-15% пациентов развиваются более организованные агрегаты, имеющие черты сходства с герминативными центрами (GC) [100, 121].

Имеются данные, согласно которым значительная роль в эктопическом лимфоидном неогенезе принадлежит цитокинам семейства TNF, хемокинам CXCL13 и CCL21, адгезионным молекулам MAdCAM [68].

Как указывалось выше, принципиально единые патоморфологические изменения при системной прогрессирующей дезорганизации рыхлой волокнистой соединительной ткани свойственны всем нозологическим формам ИВРС. Это же касается и лимфоидного неогенеза. В качестве иллюстрации сказанного приводим рисунок 7 (см. 3-ю стр. обложки), где представлены фолликулоподобная структура в синовиальной оболочке при РА слева и фолликулоподобная структура в дерме и в мышечной ткани при СКВ. Видно, что морфологическая организация этих структур при РА и СКВ имеет черты определенного сходства. Важен тот факт, что процент мононуклеаров и нейтрофилов, подвергшихся апоптозу и находящихся в фолликулоподобных структурах при СКВ статистически значимо превышал аналогичные показатели в контрольной группе и коррелировал со степенью тяжести клинического течения СКВ [24].

Лимфоидный неогенез свойственен и для других иммуновоспалительных заболеваний – тиреоидита Хашимото, миастения гравис, *Helicobacter pylori* – индуцированного гастрита [68].

На рисунке 8 (см. 3-ю стр. обложки) представлена картина фолликулоподобной структуры в щитовидной железе при тиреоидите Хашимото слева и аналогичной структуры при дерматомиозите справа. И в этом случае прослеживается структурная аналогия.

Эктопический лимфоидный неогенез документирован при синдроме Шегрена (рис. 9, см. 3-ю стр. обложки).

Видно, что лимфоплазмочитарные инфильтраты в слюнной железе при синдроме Шегрена принимают формы фолликулоподобных лимфоидных структур. При этом в лимфоплазмочитарных инфильтратах большинство клеток составляли $CD4^+ \alpha\beta$ Т-лимфоциты и только 5-15% клеточного инфильтрата относились к В-лимфоцитам, плазматическим клеткам и $CD8^+$ лимфоцитам. Так же как и при РА, при синдроме Шегрена в КВИ интенсивно экспрессируется хемокин CXCL13, обладающий выраженными

свойствами привлекать в очаг провоспалительные клетки. В местах компактного скопления В-лимфоцитов в виде очаговых инфильтратов в слюнных железах при синдроме Шегрена была определена продукция анти-Ro/SSA и анти-La/SSB аутоантител [28, 159].

К числу причин скопления лимфоцитов в очаге воспаления с последующим формированием фолликулоподобных структур при синдроме Шегрена относят и экспрессию аллелей (HLA)-DR, B7.1 и B7.2 на эпителии воспаленных слюнных желез. В лимфоплазмочитарных инфильтратах Т- и В-лимфоциты располагались в отдельных зонах, напоминающих Т-зависимые и В-зависимые зоны во вторичных лимфоидных органах. Присутствие в подобных лимфоплазмочитарных инфильтратах, напоминающих зародышевые центры, признаков АГ-специфической клональной пролиферации В-лимфоцитов и плазматических клеток подтверждает гипотезу эктопического лимфоидного неогенеза и продукции ауто-АТ [149]. Кроме этого, в этих же локусах определялись посткапиллярные вены, выстланные высоким эндотелием, где происходит миграция КВИ в очаг воспаления. Для этого процесса необходима продукция белков семейства TNF, а также хемокинов CXCL13 и CCL21, привлекающих к очагу воспаления Т- и В-лимфоциты [69].

В целом важной особенностью формирования ELS является факт присутствия в них плазматических клеток, продуцирующих ауто-АТ. По литературным данным, это определено также при рассеянном склерозе, при СКВ, при отторжении трансплантатов почек и сердца.

Взаимодействия Т-клеток с В-клетками в условиях ELS могут воспроизводить многие ключевые особенности продуктивных взаимодействий в лимфоидных фолликулах вторичных лимфоидных органов. Это касается соматических гипермутаций, переключения синтеза классов иммуноглобулинов и дифференцировки плазматических клеток, что наблюдается, например, в воспаленной синовиальной оболочке при РА в фолликулоподобных структурах или в тубулоинтерстициальных клеточных агрегатах в почках при волчаночном нефрите [38, 71, 136].

Накопление лимфоцитов и плазматических клеток в хронически воспаленных тканях происходит при многих заболеваниях и для обозначения этих явлений некоторые авторы предлагают термин «лимфоплазматический инфильтрат», который нередко встречается при описаниях патоморфологии биоптатов.

Таким образом, срыв аутоотолерантности и аутоиммунизация при ИВРЗ создают условия для формирования эктопических лимфоидных структур. Структурно-функциональная организация этих структур отражает состояние гиперреактивности иммунной системы, эффекторная фаза которой связана с образованием ауто-АТ и ауто-реактивных Т-лимфоцитов.

ГЗТ-гранулемы при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

По определению «гранулема — это компактная (организованная) совокупность зрелых, активированных мононуклеарных фагоцитов и лимфоцитов, которая необязательно сопровождается дополнительными признаками, такими как некроз» и далее «гранулема отличается от хронического воспалительного инфильтрата характерной организацией зрелых макрофагов в компактную структуру». Макрофаги приобретают вид «эпителиоидных» клеток, которые в силу невыясненных причин могут организовываться в гигантские, многоядерные клетки по типу гигантских клеток Лангханса. Можно сказать, что гранулемы при ИВРЗ являются выражением иммунологической активности КВИ [63, 116].

Несмотря на то, что история изучения гранулем и гранулематозного воспаления насчитывает более 150 лет, патофизиологический и иммунологический смысл этой структуры осознан не до конца. Считается, что в целом предназначение гранулем — это защита от внутриклеточных патогенов и ограничение очага гранулематозного воспаления. Однако идентифицировать этиологически важный патогенный агент в ревматических гранулемах не удастся. Гранулемы при ИВРЗ относят к клеточной гиперергической реакции врожденного и адаптивного иммунитета, вбирающие в себя признаки продуктивного воспаления *in situ*. Гранулемы, или узелки, сравнивают с обоюдоострым мечом, влияющим как на элиминацию этиологического агента, так и на тканевую деструкцию [168].

Кандидатными триггерами ревматических гранулем и аутоиммунного ответа могут быть продукты дезорганизации соединительной ткани, в частности очаги фибриноидного некроза. На рисунке 10 (см. 3-ю стр. обложки) представлена патоморфологическая картина ревматоидного узелка при ревматоидном артрите (слева), а также гранулемы в миокарде при ревматической лихорадке. Видно, что мононуклеарные клетки, прежде всего, клетки макрофагально-моноцитарного ряда и лимфоциты в составе КВИ, четко

располагаются вокруг очагов фибриноидного некроза.

Характерной чертой формирования гранулематозного воспаления при ИВРЗ является присутствие признаков гиперергического клеточного иммунного ответа, или, иными словами, гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), в которой центральная роль принадлежит клеткам макрофагально-моноцитарного ряда. К признакам ГЗТ при гранулематозном воспалении при ИВРЗ относят активированное состояние клеток в составе гранулем, их компактное расположение, обеспечивающие межклеточные контакты, прежде всего, макрофагально-лимфоцитарные, трансформация макрофагов в эпителиоидные клетки, продукция широкого спектра провоспалительных цитокинов, провоспалительных хемокинов, ростовых факторов, факторов ангиогенеза, интерферонов. Именно поэтому этот тип гранулем носит название ГЗТ-гранулем.

Этапность формирования ГЗТ-гранулем и клеточный состав определяет спектр провоспалительных хемокинов, источниками которых являются активированные клетки макрофагально-моноцитарного ряда, Т-лимфоциты, эндотелиоциты. В составе гранулем находят макрофаги (CD68⁺), моноциты (CD14⁺), Т-лимфоциты (включая CD4⁺Th1, CD4⁺Th17, CD8⁺), плазмацитоидные и миелоидные дендритные клетки (CD205⁺), В-лимфоциты, естественные киллеры (CD56⁺), нейтрофилы, эозинофилы [114, 116]. Находящиеся в очаге гранулематозного воспаления антиген-специфические CD4⁺ клетки дифференцируются в Th1 CD4⁺ субпопуляцию — эффекторов ГЗТ, с последующей продукцией провоспалительных цитокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-12, TNF α , IFN γ , провоспалительных хемокинов — IL-8, CC-хемокинов, хемоаттрактантного моноцитарного белка 1 (MCP-1), макрофагального воспалительного протеина 1 α (MIP-1 α), иммунорегуляторных цитокинов — IL-10, IL-12, а также матриксных металлопротеиназ (MMP1-9), витронектина, остеопорина, фибронектина. В продукции указанных растворимых факторов активное участие принимают Мф, ДК и гигантские клетки [102, 103].

Подобный широкий хемо-цитокиновый спектр обеспечивает дополнительное привлечение провоспалительных клеток *in situ*. Стимулом для дифференцировки CD4⁺ клеток в направлении Th1 является продукция клетками макрофагально-моноцитарного ряда IL-12 и IL-18, а также продукция естественными киллерами IFN γ [74, 84].

Подчеркнем важное качество ГЗТ-гранулем. Речь идет о том, что описанная выше последовательность дезорганизации соединительной ткани сопровождается сопряженной клеточной реакцией и на этапе фибриноидных изменений и фибриноидного некроза эта клеточная реакция может приобретать вид ГЗТ-гранулем. Участки дезорганизации соединительной ткани одновременно служат источником ауто-АГ. Заметно усиливаются АГ-зависимые контакты Мф с лимфоцитами. Наиболее ярко эти процессы представлены в гранулемах Ашофа-Талалаева при ревматической лихорадке. Тот факт, что клетки макрофагально-моноцитарного ряда, в типичном выражении, веерообразно располагаются вокруг центрального участка фибриноидного некроза, подчеркивает возможность контакта АПК с продуктами дезорганизации соединительной ткани с потенциально ауто-АГ свойствами.

Сказанное иллюстрируется картиной гранулемы Ашофа-Талалаева при ревматическом миокардите, представленной на рисунке 11 (см. 3-ю стр. обложки), где определяются крупные гиперхромные (активированные) макрофаги, а также лимфоциты, располагающиеся вокруг и в очагах фибриноидного некроза.

На Мф и ДК в очагах иммунного гранулематозного воспаления существенно возрастает экспрессия аллелей локусов МНС II класса — HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, а также маркера CD205. Одновременное присутствие пролиферирующих Т-лимфоцитов формирует возможность индукции аутоиммунного ответа *in situ*. В качестве иллюстрации сказанного приводим снимки препаратов иммунных гранул при болезни Крона. На рисунке 12 (см. 3-ю стр. обложки) видны четкая компактная локализация CD205⁺ клеток в центре иммунных гранул. CD205 — это мембранный маркер, экспрессирующийся на активированных Мф и ДК. В этих же местах также четко визуализируются интрагранулематозные CD3⁺ лимфоциты (зеленый цвет) в тесном контакте с CD205⁺ клетками (красный цвет). Причем CD3⁺ лимфоциты являются пролиферирующими, что документируется по экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki67 [114].

Очевидно, что микроокружение в иммунных гранулемах, межклеточные контакты создают благоприятные условия для аутоиммунного ответа *in situ*.

Гранулемы, свойственные ИВРЗ, морфологически относят к эпителиоидным гранулемам. Формирование таких компактных мононуклеарных инфильтратов обусловлено деятельностью

активированных резидентных макрофагов и эмиграцией в очаг воспаления из посткапиллярных венул, высланных «высокими» эндотелиоцитами 2-го типа, моноцитов, лимфоцитов, нейтрофилов [141].

Гранулемы являются мобильной структурой, отражающей стадию воспаления и, в определенной степени, ее нозологическую специфичность. Пул резидентных (тканевых) макрофагов на несколько порядков превышает их костномозговой резерв [6]. Формирование ГЗТ-гранулем является преимущественно местным процессом. Моноциты, Т- и В-лимфоциты гематогенного происхождения дополняют клеточный состав этих гранул. Активация клеток макрофагально-моноцитарного гистогенеза в составе ГЗТ-гранулем есть в том числе и повышение фагоцитарной активности этих клеток в отношении продуктов дезорганизации соединительной ткани с последующей возможностью выполнения АГ-презентирующей функции и индукцией ауто-иммунного ответа. Можно проследить и некоторую общность структурно-функциональной организации между упомянутыми выше фолликулоподобными (эктопическими) лимфоидными структурами (ELS) и ГЗТ-гранулемами. Эта общность касается, прежде всего, во-первых, идентичности клеточного состава, во-вторых, важной роли макрофагов и их производных в формировании этих патоморфологических структур, в-третьих, спектр продуцируемых провоспалительных цито- и хемокинов практически полностью совпадает, в-четвертых, микроокружение и в том, и в другом случаях создает возможность индукции извращенного аутоиммунного ответа на собственные АГ-детерминанты. Если сравнить картину гранулемы в миокарде при ревматической лихорадке, представленную слева на рисунке 11 (см. 3-ю стр. обложки), с картиной фолликулоподобной структуры в синовиальной оболочке при РА, представленной на рисунке 6 (см. 2-ю стр. обложки) и на рисунке 7 (см. 3-ю стр. обложки) слева, то очевидное сходство этих структур не вызывает сомнений. В процессах формирования ГЗТ-гранул и прогрессировании воспалительного процесса также очевидно значение ангиогенеза *in situ*. В частности, показано, что пролиферация эндотелия капилляров совпадает во времени с пиком мононуклеарной инфильтрации при гранулематозном воспалении [144].

Адгезионные лиганд-рецепторные взаимодействия и эндотелиальная реакция при хроническом продуктивном воспалении

«Точкой отсчета» формирования КВИ является сосудисто-эндотелиальная реакция в ответ

на действие любого триггера, результатом которой является ангиогенез. Ангиогенез — это биологический процесс, посредством которого образуются кровеносные сосуды. Этот процесс сопровождается развитием адгезионных межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий, продукцией и рецепцией цито- и хемокинов, эмиграцией клеток из кровотока и активацией резидентных клеток различного гистогенеза и функционального предназначения *in situ*. Очевидна тесная взаимосвязь и разнонаправленная взаиморегулируемость этих процессов, наиболее демонстративно представленная в виде провоспалительных, аддитивных, синергических и ингибирующих эффектов цито- и хемокинов. В этих условиях создается микроокружение, благоприятствующее индукции процессов иммуногенеза.

В инициации КВИ значительная роль принадлежит активности эндотелиоцитов. Диапедез лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов в очаг воспаления происходит преимущественно в области посткапиллярных венул, выстланных «высокими» эндотелиоцитами 2-го типа. Трансформации эндотелиоцитов в «высокий» эндотелий в частности способствуют продуцируемые активированными Т-лимфоцитами цитокины (IL-1 α , IFN γ , TNF α и др.). Активированные эндотелиоциты экспрессируют спектр адгезионных молекул с различными функциональными свойствами. Лиганд-рецепторные взаимодействия между активированными эндотелиоцитами и клетками крови включают в себя десятки молекул, формируя по аналогии с иммунологическим синапсом — синапс эндотелиально-клеточный.

На активированных эндотелиоцитах экспрессируется следующий спектр адгезионных молекул, обеспечивающих диапедез клеток крови в очаг воспаления, начиная с этапа прилипания и роллинга и заканчивая выходом клетки из сосудистого русла: селектины — Р-селектин (CD62P) и Е-селектин (CD62E); из иммуноглобулинового семейства — молекулы VCAM и их разновидности (VCAM-1(CD106), ELAM-1, ICAM-1(CD54), ICAM-2); CD34 для рецепторов миелоидных клеток; муцин GlyCAM-1.

Рецепторами рециркуляции, или хоминг-рецепторами, на лимфоцитах для указанных молекул являются VLA-4 (CD49d/CD29), LFA-1 (CD11a/CD18), CD44. Кроме этого на лейкоцитах конститутивно экспрессированы L-селектины, рецепторы для Р- и Е-селектинов (PSGL-1). Основной интегрин лимфоцитов LFA-1, пред-

ставлен и на поверхности моноцитов и макрофагов. Интегрин Mac-1 экспрессируется на Мф, а также на других миелоидных и НК-клетках. Третий интегрин этой группы — p150/p95 — маркер ДК, но он также представлен на других клетках миелоидного ряда. β_1 -интегрины (молекулы группы VLA) взаимодействуют с компонентами межклеточного матрикса (фибронектином, ламинином, коллагеном, фибриногеном) и мембранным рецептором VCAM-1 (CD106).

На активированном эндотелии экспрессируются:

VLA-1 (CD49a/CD29), его лиганды — коллаген I-V типов;

VLA-3 (CD49b/CD29), его лиганды — фибронектин, коллаген I-V типов, ламинин;

VLA-5 (CD49e/CD29), его лиганды — фибронектин, витронектин;

VLA-6 (CD49f/CD29), его лиганды — ламинин;

LPAM-1 (CD49d/X), его лиганды — фибронектин;

CD51/CD6, его лиганды — витронектин, фибриноген.

Также на активированном эндотелии экспрессируются рецепторы интегринов — ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1 (CD106) [124, 133].

Таким образом, все многообразие и специфичность адгезионных взаимодействий активированного эндотелия с клетками крови и межклеточным матриксом обеспечивает процесс эмиграции лейкоцитов из кровяного русла в очаг воспаления, что является важным фактором организации КВИ при ревматических заболеваниях.

Не менее важным фактором организации КВИ и межклеточных взаимодействий *in situ* является экспрессия на активированных эндотелиоцитах аллелей МНС II класса. Показано, что под влиянием IFN γ на эндотелиоцитах в воспалительном очаге аллели HLA-DR экспрессируются на повышенном уровне, тем самым создавая условия для презентации антигенного материала и инициации аутоиммунного ответа [77].

Патогенез ХПВ неразрывно связан с реализацией разнонаправленной функциональной активности спектра провоспалительных цито- и хемокинов, продуцируемых как клетками воспалительного инфильтрата, так и доставляемых гематогенным и лимфогенным путем. Основными цитокинам, влияющим на функции эндотелиоцитов при ХПВ, являются IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α , TNF β , IFN α , IFN β , IFN γ , трансформиру-

ющий фактор роста β (TFG- β). К некоторым из них (IL-1 β и TNF α) эндотелиоциты конститутивно экспрессируют рецепторы. Под влиянием этих цитокинов происходит активация эндотелиоцитов с трансформацией в высокий эндотелий и экспрессией ряда мембранных молекул, включая Р- и Е-селектины, рецепторы L-селектинов и интегринов (ICAM-1, VCAM-1), а также секрецией провоспалительных цитокинов и хемокинов.

Важным свойством провоспалительных цитокинов, в избытке продуцирующихся в очаге продуктивного воспаления при ревматических заболеваниях, является их прокоагулянтная активность. Известны широкие перекрестные связи между иммунной системой и системой гемостаза. При ХПВ, вирусных инфекциях эти связи сопровождаются усилением сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза. Появился даже термин «иммунотромбоз» в связи с вирусом SARS-CoV-2. Результатом подобных процессов является распространенные микротромбы, имеющие существенное патогенетическое значение. IL-6 способствует продукции активированных тромбоцитов с последующей их агрегацией. TNF α и IL-2 увеличивает продукцию ингибитора важного тромболитического фактора — плазминогена (PAI-1) с последующим усилением тромбообразования. IFN γ усиливает продукцию тромбоцитов с тромбогенными эффектами [96].

Известна прокоагулянтная активность IL-1, обусловленная экспрессией на активированном эндотелии фактора III с последующим образованием микротромбов. IL-1 способствует экспрессии адгезионных молекул на эндотелии из группы интегринов и селектинов. Кроме этого, IL-1 стимулирует продукцию эндотелиоцитами сильного вазоконстриктора — эндотелина-1. Другой цитокин — IL-6, способствует пролиферации клеток КВИ. Цитокины из группы TNF и IFN усиливают экспрессию антигенов МНС I и II классов на клетках макрофагально-моноцитарного ряда. К патогенетически важным свойствам TNF α нужно отнести стимуляцию неоангиогенеза и репарацию эндотелиоцитов в очаге воспаления. Сильными стимуляторами неоангиогенеза являются группа провоспалительных СХС-хемокинов (CXCL9 — CXCL16) и самый важный из них — IL-8. Кроме этого, IL-8 способствует привлечению и аттракции нейтрофилов в очаг воспаления и осуществления ими функции так называемых «нейтрофильных ловушек», которые усиливают тромбообразование [101].

Очевидно, что адгезионные лиганд-рецепторные взаимодействия и связанные с этим процессы неоангиогенеза являются важными патогенетическими звеньями развития ХПВ и формирования КВИ. Гетерогенность взаимодействующих клеток и молекул подчеркивает многокомпонентность и взаимозависимость процессов. Исходя из представленной картины, весьма перспективны исследования в области таргетной терапии ИВРЗ, а также разработки методов оценки стадии и активности ИВРЗ.

Провоспалительные хемо- и цитокины при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

Хемокины представляют собой семейство небольших (8-10 кДа) хемотактических цитокинов, которые контролируют процессы миграции клеток врожденного и приобретенного иммунитета и являются ключевыми факторами формирования КВИ. В настоящее время идентифицировано более 50 хемокинов и 19 рецепторов хемокинов. Хемокины являются секретлируемыми сигнальными белками и классифицируются на четыре основных группы в зависимости от местоположения остатков аминокислоты цистеина: хемокины группы XC (которые содержат один концевой цистеин), хемокины группы CC (которые имеют два соседних концевых цистеина), хемокины группы CXC (которые имеют два цистеина, разделенных одной другой аминокислотой) и хемокины группы CX3C (которые имеют два цистеина, разделенных тремя аминокислотами). Хемокиновые рецепторы представляют собой трансмембранные белки, которые связаны с цитоплазматическими G-белками и регулируют миграцию иммунных клеток. Эти рецепторы разделены на группы CCR, CXCR, XCR и CX3CR [59].

Иммобилизация хемокинов в основном в веществе рыхлой неоформленной соединительной ткани (коллаген адсорбирует хемокины) и на поверхности клеток формирует градиент их концентрации, необходимый для направленной миграции клеток в очаг воспаления. При ИВРЗ высокие уровни хемокинов и их рецепторов индуцируют миграционную активность иммунных клеток в пораженные органы и ткани, включая, Мф, ДК, Т-клетки и В-клетки, Нф [106]. Этому способствует связывание провоспалительных хемокинов с базальной мембраной веноулярного отдела сосудистого русла, выстланного высоким эндотелием, а также с коллагеновыми волокнами (коллаген IV типа), что также формирует градиент хемоаттрактантов и стимулирует хемотаксис клеток в очаг ХПВ [172].

Весьма существенна роль провоспалительных хемокинов как интегративных факторов между врожденным и адаптивным иммунитетом. Так, активация дендритных ДК и Мф в том числе и продуктами дезорганизации соединительной ткани посредством PAMP — рецепторов (TLR, NOD1, NOD2) стимулирует эти клетки к продукции хемокинов групп CXCL, CCL, CCR, привлекающих клетки адаптивного иммунитета — Т- и В-лимфоциты за счет взаимодействия с хемокиновыми рецепторами CCR7 и CXCR4 в очаге воспаления [131].

При РА в сыворотке крови, синовиальной жидкости и непосредственно в синовиальной ткани определяются повышенные уровни хемокинов группы CXС (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8 (IL-8), CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13 и CXCL16), хемокинов группы CC (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21 и CCL25) и хемокинов группы XC (XCL1 и XCL2). Каждый из указанных хемокинов имеет свои функциональные особенности, но их всех объединяет конечные провоспалительные эффекты. Более того, уровень и состав хемокинов, в частности хемоаттрактанта CXCL13, служит маркером активности воспалительного процесса при РА. Основными продуцентами указанных хемокинов являются синовиальные Мф и фибробласты, фолликулярные ДК, синовиальные эндотелиальные клетки и Нф, т.е. все клетки принимающие активное участие в формировании КВИ. В реализации патофизиологических эффектов указанных хемокинов при РА принимают участие рецепторы хемокинов из группы CXCR, включая CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5 и CXCR6 [113].

При СКВ, также как и при РА, определяется увеличение в сыворотке крови и в почках хемокина CXCL13 и уровень этого хемокина коррелирует с активностью заболевания. Продуцентами этого хемокина являются почечные дендритные клетки. Есть данные о повышении при СКВ уровней хемокинов из группы CC и CXС. Кумуляции Т-лимфоцитов в очагах продуктивного воспаления способствуют хемокиновые рецепторы CXCR3-5, CCR1, CCR2, CCR5, CX3CR1, CXCR3 и CCR5, В-лимфоцитов — рецептор CXCR5, а рецепторы CCR1, CCR2 и CX3CR1 регулируют миграцию моноцитов [53].

У пациентов с ССД определяется повышение хемокинов группы CXС (CXCL3-11 и CXCL16) в сыворотке или плазме. Считается, что основными продуцентами этих хемокинов являются плазмацитоидные ДК, локализующиеся в том

числе и в воспаленной коже. Интересно, что при ССД определяется увеличение рецепторов CCR2 и CX3CR1 и эта повышение коррелирует с увеличением выработки CCL2 фибробластами кожи и увеличением выработки CX3CL1 эндотелиальными клетками кожи [18, 36].

При ПМ повышается уровень CXCL9 и CXCL10 хемокинов. Считается, что при этом заболевании продуцентами CXCL10 являются CD68⁺ макрофаги, а также CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоциты, тогда как при дерматомиозите продуцентами этого же хемокина являются CD4⁺Т-лимфоциты и CD68⁺ макрофаги [45].

В мышечных биоптатах больных ПМ определяется повышенная экспрессия следующих хемокинов: CCL2, CCL3, CCL4 и CX3CL1. При дерматомиозите эндотелиальные клетки являются основными продуцентами CCL2, тогда как при полимиозитах макрофаги и CD8⁺Т-лимфоциты могут быть основными клеточными источниками CCL2 и CX3CL1. Что касается хемокиновых рецепторов, то известно, что в мышцах пациентов с ПМ присутствует большое количество Т-клеток с хемокиновым рецептором CXCR3, моноцитов с хемокиновым рецептором CCR2 и макрофагов с хемокиновым рецептором CX3CR1 [46, 151].

Выраженной хемотаксической активностью в отношении, прежде всего, нейтрофилов, а также Т-лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов, обладает IL-8, принадлежащий к группе провоспалительных CXС хемокинов. Он также инициирует эмиграцию клеток из сосудов в ткань. IL-8 продуцируется активированными эндотелиоцитами макрофагами и моноцитами. Этот провоспалительный хемокин способен связываться к глюкозаминогликанами межклеточного матрикса. Благодаря этому значительная часть IL-8 иммобилизуется, что очень важно для формирования градиента его концентрации в тканях, необходимого для хемотаксиса практически всех клеток воспалительного инфильтрата. Все эффекты продуцируемых хемокинов реализуются за счет взаимодействия с хемокиновыми рецепторами двух основных групп — CCR и CXCR. Все клетки воспалительного инфильтрата экспрессируют указанные рецепторы к хемокинам. Необходимо учитывать, что специфичность хемокиновых рецепторов характеризуется вырожденностью: с одним и тем же рецептором может взаимодействовать до 10 хемокинов

При ИВРЗ продукция провоспалительных цитокинов как в очаге воспаления, так и в системной циркуляции достигает максимальных значений. Речь идет, прежде всего, о таких клас-

сических провоспалительных цитокинах, как IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-8, TNF α , TNF β .

Из цитокинов, патогенетически важных при ИВРЗ и принимающих участие в формировании КВИ, большее внимание уделяется IFN I типа, поскольку интерпретация IFN-зависимых механизмов при ревматических заболеваниях является существенной частью при создании персонализированных схем лечения, связанных с применением многочисленных препаратов интерферонового ряда, в том числе и генноинженерных [8].

К IFN I типа относятся около 17 генетически детерминированных вариантов IFN и наиболее важными из них являются IFN α и IFN β . Основными клетками, продуцирующими IFN α являются плазмцитоподобные ДК, являющиеся активными участниками КВИ, а продуцентами IFN β являются большинство ядродержащих клеток КВИ — фибробласты, макрофаги, дендритные клетки, синовиоциты, также находящиеся в составе КВИ. Основными индукторами усиленной продукции IFN I типа являются инфекционные агенты (вирусы, бактерии), которые, взаимодействуя с мембранными TLR рецепторами и цитоплазматическими RIG рецепторами всех перечисленных клеток, активируют их и побуждают к усиленному синтезу IFN I типа. Однако не исключается роль продуктов дезорганизации основного вещества соединительной ткани в активации IFN-продуцентов.

В целом группа интерфероновых цитокинов в контексте ИВРЗ выполняет роль координатора врожденного и адаптивного иммунитета. В настоящее время при описании патогенетических механизмов заболеваний, характеризующихся преобладанием активации механизмов врожденного иммунитета, прежде всего РАМП-рецепторов, при отсутствии обнаруживаемых признаков аутореактивности Т- и В-клеток применяют термин «аутовоспаление». В тех же случаях, когда очевидна аутореактивность сенсibilизированных Т- и В-клеток, в том числе и в составе КВИ, говорят об «аутоиммунных заболеваниях» [22].

Конечно, подобное разделение весьма условно, вместе с тем оно применяется с целью определения патогенетического звена, наиболее «чувствительного» к медикаментозной терапии и интерпретации многочисленных данных о селективности иммуотропных средств и воздействий. Подчеркивается значительная роль интерфероновых цитокинов в патогенезе хронических воспалительных заболеваний. Сывороточным уровням IFN I типа отводится роль биомаркеров

иммуновоспалительных заболеваний и даже вводится понятие «интерферопатий» [21, 43].

В этом отношении весьма важным являются данные, свидетельствующие о том, что ауто-АГ, образовавшиеся в результате деструктивных, воспалительных процессов в рыхлой волокнистой соединительной ткани, взаимодействуют с мембранными TLR7 и TLR9 пДК. Это взаимодействие сопровождается усиленной продукцией пДК IFN I типа, а также провоспалительных цитокинов [104].

Продукция IFN I типа регулируется несколькими поверхностными рецепторами в плазмцитоподобных ДК, включая TLR7 и TLR9. Эти же клетки в составе КВИ, продуцируя в больших количествах IFN I типа и IL-6, способствуют дифференцировке В-лимфоцитов в плазматические клетки — источник ауто-АТ [73, 152].

Внутриклеточный синтез IFN I типа регулирует фактор 5 (IRF5). В свою очередь гиперпродукция IFN I типа усиливает экспрессию TLR рецепторов на клетках макрофагально-моноцитарного типа, способствуя тем самым индукции аутоиммунного ответа и аутовоспаления. Этот механизм показан, в частности, при СКВ [54, 148].

Увеличение уровня IFN I типа как в системной циркуляции, так и в КВИ, способствует прогрессированию и утяжелению воспалительного процесса, включая и местный. При СКВ, РА, болезни Шегрена уровень IFN I типа в сыворотке крови существенно повышен, наряду с повышенным риском развития этих заболеваний [49, 67]. Это повышение обусловлено в том числе и активностью вышеобозначенных клеток *in situ*. В мышечных биоптатах при аутоиммунных миозитах в составе КВИ обнаруживаются пДК активированные Мф и лимфоциты. Эти клетки интенсивно продуцируют IFN I типа, повышающие экспрессию аллелей МНС I класса. Также интерфероны, продуцируемые клетками врожденного и адаптивного иммунитета, вызывают повышенную продукцию нескольких ауто-АГ, специфичных для аутоиммунного миозита и дерматомиозита. К ним относятся TRIM21, MDA5 и IFIT3 [95].

Аналогичную роль при ХВЗ играет и группа цитокинов, принадлежащих к семейству IL-1. Главными продуцентами IL-1 являются клетки КВИ — макрофаги и Th1 CD4⁺ клетки, соответственно. IL-1 β является важным медиатором как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Свою провоспалительную активность этот цитокин реализует за счет активации цитозольных инфламмасом [140]. Рецепторы семейства IL-1 содержат домен, гомологичный цитоплазматиче-

ским доменам всех TLR. Следовательно, воспаление, индуцированное взаимодействием соответствующих лигандов с TLR рецепторами вызывает активацию аналогичных сигнальных активационных путей рецепторов семейства IL-1 [16].

Провоспалительную активность семейство IL-1, впрочем, как и все другие провоспалительные цитокины, реализует как в *locus morbi*, так и в системной циркуляции, обуславливая тем самым патогенетическую связь этих цитокинов между врожденным и адаптивным иммунитетом. Эта связь была продемонстрирована при некоторых моногенных интерферопатиях. Резкое возрастание продукции IL-1 β явилось результатом мутаций в генах цитозольных рецепторов врожденного иммунитета — NLRP3 и NLRC4, TLR5 и семейства рецепторов S100. Эти явления имели место при таких заболеваниях как РА, ювенильный полиартрит, ревматическая лихорадка, подагра, сердечно-сосудистые болезни, сахарный диабет 2-го типа, метаболический синдром, при опухолях [34, 75, 107].

Таким образом, продукция и рецепция провоспалительных хемо- и цитокинов, широкий спектр адгезионных лиганд-рецепторных взаимодействий обеспечивает миграцию клеток гематогенного происхождения, а также активацию резидентных клеток в очаге воспаления. Эти процессы являются важным патогенетическим звеном формирования КВИ при ИВРЗ, обуславливающих динамику и исход патологического процесса. Таргетное использование ингибиторов провоспалительных хемо-цитокинов является одним из наиболее патогенетически обоснованных способов лечения ИВРЗ.

Ангиогенез и эндотелиальная реакция при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

В широком комплексе процессов, составляющих патогенетический базис формирования КВИ при ИВРЗ, ангиогенез занимает одну из ключевых позиций. Ангиогенез — это биологический процесс, при котором образуются кровеносные сосуды. В условиях ХПВ этот процесс обозначают еще термином неоангиогенез, подчеркивая тем самым участие новообразованных сосудов в индукции и прогрессировании ХВП. Неоангиогенез является строго контролируемым процессом, при котором фундаментальную роль играют пролиферативная активность эндотелиоцитов и функциональные свойства этих клеток, приобретаемые ими при активации. Речь идет о «высоких» эндотелиоцитах 2-го типа посткапиллярных венул. Как отмечалось выше, при выделении «физиологической системы соединитель-

ной ткани», по А.А. Богомольцу, значительная роль отводилась функциональной активности эндотелиоцитов в норме и при патологических процессах. Этим обусловлено существующее до нынешнего времени другое обозначение этой системы — «ретикуло-эндотелиальная система», впервые введенное в начале 20 века немецким патологом К.А. Ашоффом. При ИВРЗ активированные эндотелиоциты, помимо участия в процессах неоангиогенеза, приобретают уникальные качества, связанные в том числе с приобретением ими некоторых свойств АГ-презентирующих клеток. Речь идет о повышении экспрессии этими клетками аллелей МНС II класса под влиянием IFN I типа, провоспалительных хемокинов [129]. Этому способствует формирование фолликулоподобных структур (эктопический лимфоидный неогенез) и клеточное микроокружение, обеспечивающее продукцию и рецепцию провоспалительных цито- и хемокинов. Активное участие в процессах ангиогенеза при РА отводится межклеточным контактам макрофагов и фибробластов и продукции ими IL-6 и IL-8 [56].

Большое влияние на процесс ангиогенеза оказывают продукция и рецепция ангиогенных и ангиостатических факторов, а также соблюдение баланса между ними. В случае доминирования продукции и рецепции ангиогенных факторов «высоких» эндотелиоцитов 2-го типа, последние приобретают свойства, индуцирующие аутоиммунный ответ.

Ангиогенез — это запрограммированный каскад последовательных событий. В зоне воспаления ангиогенные факторы активируют эндотелиоциты, которые, в свою очередь, могут продуцировать протеолитические ферменты, в частности матричные металлопротеиназы (ММП 1-9) и активаторы плазминогена. Это приводит к деградации базальной мембраны сосудов и периваскулярного внеклеточного матрикса. Эндотелиоциты пролиферируют и мигрируют в периваскулярную область и, таким образом, образуются «первичные сосудистые ростки». Дальнейшая трансформация этих ростков приводит к образованию морфологически хорошо идентифицируемых «капиллярных петель» с последующим синтезом новой сосудистой мембраны и капиллярного образования. Эндотелиальные клетки высвобождаются из первичных ростков и петель, образуя вторичные и последующие генерации сосудистых образований [85, 157]. Особенно ярко процесс неоангиогенеза представлен при РА, который считается важным фактором прогрессирования ревматоидного синовита. Подчеркивая

патогенетическую важность этого процесса, некоторые авторы предлагают рассматривать РА в качестве «ангиогенной болезни» [155].

Ангиогенез регулируется сложным каскадом ангиогенных и ангиостатических факторов. Эти факторы могут быть отнесены к различным группам медиаторов системы иммунитета, а перечень и баланс этих факторов существенно разнится при ревматических заболеваниях. Так, при РА, системной склеродермии, СКВ, при полимиозитах, при системных васкулитах к ангиогенным факторам относят:

- ростовые факторы — фактор роста фибробластов (FGF), сосудистый эндотелиальный ростовой фактор (VEGF), фактор роста гепатоцитов (HGF). Эти факторы могут освобождаться в процессе дезорганизации соединительнотканного матрикса. К этой же группе относят также фактор роста тромбоцитов (PDGF), тромбоцит-активирующий фактор (PAF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста бетта (TGF- β), инсулиноподобный фактор роста I. VEGF является ключевым регулятором ангиогенеза при воспалении. Он необходим для пролиферации и миграции эндотелиальных клеток. Также этот ростовой фактор стимулирует ангиогенез, индуцируя экспрессию циклооксигеназы 2. VEGF вырабатывается в ответ на стимуляцию цитокинами, такими как TNF α , TNF β и IL-1. VEGF высвобождается периваскулярными клетками и синовиальными фибробластами [80, 134];

- провоспалительные цитокины — IL-1, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, TNF α . Причем TNF α может регулировать неоангиогенез через систему ангиопоэтина 1 и 2. Другие ангиогенные цитокины включают в себя гранулоцитарный колоние-стимулирующий фактор, онкостатин М, фактор ингибирующий миграцию макрофагов [17, 138];

- провоспалительные хемокины и их рецепторы — IL-8 (CXCL8), эпителиально-нейтрофильный активирующий протеин-78 (ENA-78, CXCL5), соединительнотканый активирующий протеин-III (СТАР-III, CXCL6), монокин-индуцированный IFN γ (MIG, CXCL9), моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (MCP-1, CCL2), макрофагальный воспалительный протеин-1 α (MIP-1 α , CCL3), лимфотаксин (XCL1), RANTES и др. Известно, что хемокины ELR-CXC являются мощными ангиогенными факторами, способными стимулировать хемотаксис эндотелиоцитов, в то время как большинство не-ELR-CXC хемокинов являются сильными ангиостатическими факторами, которые ингибируют хемо-

таксис эндотелиоцитов, вызванный хемокинами ELR-CXC. Хемокины ELR-CXC связываются с рецепторами CXCR2 и CXCR1, в то время как хемокины не-ELR-CXC связываются с рецепторами CXCR3, CXCR4 и CXCR5. Таким образом, хемокины CXC действуют как ангиогенные или ангиостатические факторы в зависимости от наличия мотива ELR [150, 156]. Что же касается хемокиновых рецепторов, участвующих в процессах ангиогенеза, то при РА СКВ определена экспрессия хемокиновых рецепторов на клетках воспалительного инфильтрата группы CXCR1-5, а также группы CCR1-10. При СКВ установлена связь с рецептором CCR4, экспрессирующимся на CD4⁺ клетках. Хемокиновые ангиогенные рецепторы CXCR2 и CXCR4 экспрессируются на активированных эндотелиоцитах. Напротив, экспрессия хемокинового рецептора CXCR3 способствует ингибированию ангиогенеза [62, 112, 119];

- компоненты деградации экстрацеллюлярного соединительнотканного матрикса — коллагена I типа, фибронектина, гепарина, ламинина, протеолитических ферментов (MMP1-9), активаторов плазминогена [143];

- некоторые адгезионные молекулы — VCAM-1, эндотелиальные интегрины β 1, β 2, β 3, тромбоцитарные адгезионные молекулы PECAM, CD31, CD105. Эти молекулы адгезии экспрессируются на активированных эндотелиоцитах [153].

Не меньшее патогенетическое значение имеют ангиостатические факторы. К ним при РА, при системной склеродермии относят TGF- β , IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, IFN α , IFN γ , хемокины группы ELR-CXC [19].

Интересны в этом отношении взаимоотношения между такими ангиогенными факторами, как ангиопоэтины. Если ангиопоэтин 1 способствует неоангиогенезу, то ангиопоэтин 2, ингибируя активность ангиопоэтина 1, снижает интенсивность формирования новых сосудов в месте воспаления. А такие провоспалительные цитокины, как TNF α и IL-1, могут стимулировать выработку ангиогенных хемокинов и факторов роста, также они увеличивают экспрессию молекул адгезии на эндотелиоцитах [108, 165].

Как видно, в процесс ангиогенеза вовлечено большое количество разнородных ангиогенных и ангиостатических факторов. Аутокринная и паракринная продукция и рецепция этих факторов всеми видами клеток воспалительного инфильтрата обеспечивает интенсивный ангиогенез в очаге продуктивного воспаления, что способ-

ствует распространению и прогрессированию процесса *in situ*. Баланс между этими факторами вносит свой вклад в направлении течения воспалительного процесса либо в сторону прогрессирования, либо в сторону стабилизации. Кроме этого, медикаментозные влияния на процесс ангиогенеза относят к числу наиболее перспективных лечебных мероприятий при лечении ИВРЗ.

Отметим важную роль в ангиогенезе Мф, находящихся в большом количестве в составе воспалительного инфильтрата. Эти клетки продуцируют ангиогенные хемокины CXCL8, CXCL5, CXCL1, CXCL7, CCL2, TNF, IL-15, IL-18, ангиогенные ростовые факторы – VEGF, фактор роста фибробластов, фактор роста гепатоцитов, тромбоцитарный фактор роста и некоторые металлопротеиназы (MMP1-9). Одновременно эти же клетки участвуют в ангиостатических эффектах, продуцируя CXCL10, CXCL9, IFN γ и тканевые ингибиторы металлопротеиназ [154].

Таким образом, формирование КВИ во многом зависит от растворимых факторов ангиогенеза. Эти факторы могут взаимодействовать друг с другом, что приводит к пролонгированию ангиогенеза, но также они могут стимулировать выработку ангиостатических факторов (отрицательная обратная связь).

Аутоантигены как триггеры иммуновоспалительных процессов при ревматических заболеваниях

При интерпретации патогенетической значимости КВИ ключевым моментом является идентификация возможных триггеров как системного, так и местного воспалительного процесса. Не исключено, что с указанными процессами связан первый этап индукция аутоиммунного ответа на полипептиды, кислые и нейтральные мукополисахариды и другие полисахаридно-протеиновые комплексы, которые могут формировать субмикроскопические структуры [13].

Триггерами деполимеризации основного вещества соединительной ткани могут быть, прежде всего, вирусные и бактериальные инфекции, интоксикации, гипоксия и др. Особое внимание уделяется инфекционным агентам, прежде всего в связи с наличием феномена перекрестной реактивности, или молекулярной мимикрии, АГ-детерминант инфекционных агентов (в частности стрептококковые АГ при РЛ) и ауто-АГ соединительной ткани. Кроме этого, инфекции могут повышать экспрессию костимуляторных молекул CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) на АПК, CD28 на Т-хелперах, CD40 на В-лимфоцитах, необходимых для презентации ауто-АГ и индукции аутоиммунного ответа. Вирусы, в частности

вирус Эпштейна–Барр, могут стать причиной поликлональной активации В-клеток с двояким эффектом. Во-первых, усилением АГ-презентирующей функции В-клеток и, во-вторых, трансформации клонов В-клеток в плазматические клетки – продуценты ауто-АГ.

Важной характеристикой аутоиммунных заболеваний является утрата толерантности с собственным ауто-АГ и индукция иммунного ответа против ауто-АГ, сопровождающегося альтерацией клеток и тканей организма. Подсчитано, что приблизительно из десятка тысяч потенциальных молекул-мишеней только около 300 могут вызвать деструктивный аутоиммунный ответ. Их отличительной чертой является широкое представительство во многих гистогенетически и функционально различных типах клеток и тканей, и конечно же, в рыхлой волокнистой не оформленной соединительной ткани. Диапазон наиболее важных целевых молекул включает в себя: ДНК-белковые комплексы, РНК-белковые комплексы, фосфолипидные белковые комплексы, простые белковые антигены и углеводные антигены [129]. Подобные целевые молекулы обнаруживаются в клеточных ядрах, в цитоплазме, во внутриклеточных органеллах и на клеточной мембране. Неудивительно, что спектр ауто-АГ при ревматических заболеваниях, включающий десятки наименований, направлен, прежде всего, на ядерный материал, несущий генетическую информацию, и на аппарат белкового синтеза, т.е. на базисные биологические системы, обеспечивающие жизнедеятельность организма. Интересной и важной особенностью ауто-АГ при иммуновоспалительных системных заболеваниях является изменения их конформации и кластеризация, связанные с внутриклеточными структурами во время апоптоза [37]. Эти процессы влияют на возможность появления ауто-АГ в клетках воспалительного инфильтрата, в частности в нейтрофилах (например изменения в структуре эластазы, миелопероксидазы, гистонов) при СКВ [57].

Отличительной особенностью кандидатных ауто-АГ при ИВРЗ является наличие цитруллинированных белков (т.е. белков, содержащих в повышенном количестве аминокислоту цитруллин). Цитруллинированные белки являются продуктом посттрансляционной модификации и включать в себя АГ-детерминанты, индуцирующие аутоиммунный ответ. Эти белки (полипептиды) находятся в большом количестве в синовиальной жидкости, а также в находящихся в этой жидкости моноцитах и нейтрофилах [128].

«Цитруллинизация» также характерна, в частности, для клеток воспалительного инфильтрата при ревматоидном синовите. Предполагается, что при эрозивном воспалении синовиальной оболочки при РА «гиперцитруллинизации» КВИ сопровождается усилением цитолитической активности CD8⁺ лимфоцитов. Сенсибилизированные CD8⁺ лимфоциты *in situ* реализуют свой цитолитический потенциал по отношению к ауто-АГ клеток-мишеней синовиальной оболочки за счет перфоринового механизма и с участием системы комплемента. Показано, что наличие активированных цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов, экспрессирующих протеолитический фермент гранзим В (GrB), является одними из лучших предикторов эрозивного синовита при РА [44].

Таким образом, наличие повышенного количества цитруллина на клетках синовиальной оболочки может индуцировать иммуноопосредованные мембранолитические механизмы эрозивного синовита при РА.

Имеются данные, свидетельствующие о значительной роли указанной выше посттрансляционной модификации структуры и цитруллинизации ауто-АГ при РА. Речь идет о презентации ауто-АГ аллелями МНС I и II класса CD4⁺ и CD8⁺ клеткам-эффекторам ревматоидного синовита. Показана статистически значимая ассоциация аллелей HLA-DRB1 с РА. В частности, аминокислотные позиции 11, 13, 71 и 74 полипептидной цепи HLA-DRβ1, кодируемой аллелями SE, вносят наиболее значительный вклад в риск развития ревматоидного синовита [123]. Эти аминокислотные позиции обуславливают феномен перекрестной презентации (антигенной мимикрии). Полипептидная цепь HLA-DRβ1 является высокоцитруллинированной. Выработка ауто-АГ к ауто-АГ в составе полипептидного продукта аллеля HLA-DRβ1 является специфичной для РА [137]. Определен карман Р4 в АГ-связывающей щели белковой молекулы МНС II класса, кодируемой аллелем HLA-DRB1*04: 01, который конформационно наилучшим образом подходит к цитруллинированным антигенным детерминантам [135].

При РА цитруллинированные пептиды могут генерироваться в изобилии, особенно в случае описанных выше иммуноопосредованных мембранолитических механизмов эрозивного синовита при РА [128]. Презентация цитруллинированных антигенных детерминант в составе аллелей HLA-DR может являться ключевым молекулярно-генетическим событием при ин-

дукции аутоиммунного ответа при РА. Есть также свидетельства того, что посттрансляционные модификации конкретных аутоантигенов, могут быть осуществлены путем процессов фосфорилирования и ацетилирования [161].

Приблизительно у 2/3 пациентов с РА определяются ауто-АГ к цитруллинированным белкам [115].

Синовиальные В-клетки продуцируют ауто-АГ, и анализ репертуара В-клеточных рецепторов показывает, что В-клетки памяти, активированные в синовиальных агрегатах, могут дифференцироваться в плазматические клетки локально внутри ткани, даже в отсутствие герминативных центров (GC) в эктопических лимфоидных структурах [71, 100].

Важные данные касаются способности мембранных и цитоплазматических паттерн-распознающих рецепторов клеток врожденного иммунитета – TLR-, NOD- и RIG-рецепторов взаимодействовать с ауто-АГ. Показано, что активация В-лимфоцитов с последующей трансформацией в плазматические клетки, продуцентов ауто-АГ, может быть усилена ауто-АГ, которые связываются с рецептором В-лимфоцитов (BCR) и эндосомными TLR7 и TLR9 [93, 94].

Есть данные о том, что дефицит TLR9 блокирует индукцию ауто-АГ против ДНК на мышинной модели СКВ. Дефицит TLR7 также предотвращает образование ауто-АГ против рибонуклеопротеинов и уменьшает тяжесть течения СКВ [39].

Таким образом, способность к связыванию и активации эндосомных TLR на В-лимфоцитах является важным фактором, определяющим иммуногенность ДНК- и РНК-содержащих ауто-АГ.

Указанная выше способность целевых ауто-АГ взаимодействовать с паттерн-распознающими рецепторами клеток врожденного иммунитета (TLR, NOD и RIG), фагоцитарная активность Мф и ДК по отношению к продуктам деструкции основного вещества соединительной ткани обеспечивает протеолитическую презентацию ауто-АГ Th1 CD4⁺ лимфоцитам в составе аллелей МНС II класса и CD8⁺ лимфоцитам в составе аллелей МНС I класса, находящихся в КВИ. Протеолиз, катализируемый каспазами, катепсинами и гранзимом В (GrB), влияет на связывание аллелей МНС I и II класса с конкретными ауто-АГ в процессе антигенной презентации, что показано при СКВ, миозите и при РА [44].

В экспрессии ауто-АГ при ИВРЗ большое значение придается активности матриксных металлопротеиназ (ММР). ММР представляют собой группу из более чем 20 цинк-содержащих протеи-

наз, взаимодействующих с компонентами основного вещества соединительной ткани и базальных мембран, в число которых входят коллагеназа и эластаза. Они являются активными участниками ремоделирования волокнистой соединительной ткани и приобретения ею ауто-АГ свойств. ММП ответственны за расщепление компонентов экстрацеллюлярного матрикса, потерю протеогликанов, что имеет место, в частности, при суставной деструкции при РА [109]. Протеолитические эффекты этих ферментов сопровождаются деградацией внеклеточного матрикса соединительной ткани и прежде всего коллагенового каркаса, преимущественно коллагена III типа. Эти процессы сопровождаются появлением в очаге воспаления фрагментов коллагена, включающих три аминокислоты — пролин-глицин-пролин (PGP). PGP-фрагменты обладают выраженной хемотактической активностью по отношению к клеткам макрофагально-моноцитарного ряда и нейтрофилов. Накапливаясь в больших количествах в соединительнотканном матриксе, коллагеновые PGP-фрагменты оказывают выраженный провоспалительный эффект. Кроме этого, подобные и другие фрагменты коллаген-эластического каркаса, появляющиеся в результате протеолитического действия всех 9 видов ММП (напомним, что коллагеназа и эластаза относятся к группе ММП) активно фагоцитируются клетками макрофагально-моноцитарного ряда *in situ* с последующей презентацией CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитам в качестве ауто-АГ и индукцией аутоиммунного ответа [27, 86, 90].

В очаге ХПВ существенно усиливается активность ММП-8 и ММП-9. В зависимости от компонента основного вещества соединительной ткани, базальных мембран и синовиальной оболочки суставов, с которым они взаимодействуют, ММП разделяют на коллагеназы (ММП-1, ММП-8, ММП-13), желатиназы А и В (ММП-2, ММП-9), стромелизины (ММП-3, ММП-10, ММП-11), матрилизины (ММП-7, ММП-26). Активность ММП-1, ММП-3, ММП-9, ММП-8, ММП-13 индуцируется IL-1 β , TNF α и тканевой гипоксией. Некоторые ММП (ММП-1, ММП-13) продуцируются фибробластами и эндотелиоцитами, принимающими участие в процессах ангиогенеза, в частности при РА [33, 118].

Значительная роль в презентации ауто-АГ принадлежит посттрансляционной модификации структуры ауто-АГ. Наличие конкретных аллелей МНС I и II класса на АГ-презентирующих клетках КВИ обуславливает статистически значимые ассоциации ревматических заболеваний

с аллельными вариантами МНС, определяющих генетическую предрасположенность к ИВРЗ. Эти процессы обеспечивают синхронизированную активацию механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, как *in situ*, так и при системных проявлениях.

Необходимо отметить, что специфичность TLR-, NOD- и RIG -рецепторов на АГ-презентирующих клетках в составе КВИ обеспечивает взаимодействие также и с нуклеиновыми кислотами бактерий и вирусов и биохимическими производными их ДНК и РНК, являющихся одними из основных кандидатов на роль триггеров иммунновоспалительного процесса при ревматических заболеваниях и формирования КВИ. В частности, речь идет о вирусах краснухи, японского энцефалита, простого герпеса, цитомегаловируса, вируса Эпштейна—Барр [60, 111].

В схемах иммунопатогенеза ревматических заболеваний большое внимание уделяется феномену антигенной перекрестной (кросс) презентации. Речь идет о фагоцитозе и о внутриклеточном ограниченном протеолизе продуктов дезорганизации рыхлой волокнистой соединительной ткани клетками макрофагально-моноцитарного ряда, дендритными клетками различного гистогенеза, клетками Лангерганса. Процессинг пептидов коллагенового каркаса, продуктов деполимеризации основного вещества, некробиотически измененных клеток, вирусных и бактериальных инфекционных агентов в очаге воспаления и последующая презентация в составе молекул МНС I класса активированным CD8⁺Т-лимфоцитам является важным аспектом перекрестной презентации. Активность коллагеназ, эластаз и других металлопротеиназ (ММП), вызывающих разволокнение и деструкцию коллагеновых и эластических волокон, — хорошо документированный факт. На этом этапе формируются перекрест АГ-детерминант рыхлой волокнистой соединительной ткани с измененными ауто-АГ и АГ флогогенных агентов. Некоторые аспекты молекулярных процессов АГ перекреста изучены. В частности, показано, что процессинг упомянутых выше пептидов и внеклеточных белков, доставляемых в эндосомы и фагосомы, происходит за счет цитозольной транслокации эндосомальных антигенов и связывания с протеосомальным комплексом вне эндоплазматического ретикула (ER), где реализуется классический путь презентации пептидов в комплексе с МНС I класса TCR CD8⁺ клеток [26].

В процессе перекрестной презентации могут участвовать внутриклеточные белки теплового

шока, такие как HSP70 и HSP90. Известно, что клетки, подвергающиеся некробиотическим изменениям, экспрессируют повышенные уровни HSP и являются мишенью для фагоцитирующих клеток. HSP относятся к системе эндогенных сигналов опасности — аларминам (DAMP) и они экспрессируются при некротическом повреждении клеток и клеточном стрессе. Внутриклеточные HSP, такие как HSP70 и HSP90, могут участвовать в цитозольной транслокации эндосомальных антигенов или связываться с протеасомой, позиционируя их для приема пептидов по мере их образования. Распознавание макрофагами ассоциированных с мембраной некротических и некробиотических клеток молекул HSP70 и HSP90 с помощью лектиноподобного окисленного рецептора LDL 1 способствует перекрестному представлению клеточных антигенов [110, 174].

Эффективная перекрестная презентация осуществляется *in vivo* с помощью CD24⁺ дендритных клеток, экспрессирующих костимуляторные молекулы, необходимые для активации CD8⁺ клеток. Экспрессия костимуляторных молекул является результатом активации внутриклеточных сигнальных путей после взаимодействия TLR4- и TLR9-рецепторов с лигандами упомянутых выше продуктов дезорганизации основного вещества соединительной ткани и коллагенового каркаса. Не исключается участие инфекционных, в частности вирусных агентов. ДК привлекаются в очаг воспаления хемокинами CCL3 и CCL4 [127]. Клетки Лангерганса, единственного типа ДК в эпидермисе кожи, также участвуют в АГ перекресте посредством рецепторов XCR1 и CLEC9A [20, 139, 163].

Как отмечалось выше, аутоиммунный ответ при ИВРС может быть обусловлен, в том числе, и перекрестной реактивностью (кросс-реактивностью) АГ-детерминант инфекционных агентов и соединительной ткани. При этом модель молекулярной мимикрии, в которой инфекции (бактерии, вирусы) выступают в качестве кандидатных триггеров, является наиболее обоснованной как с клинической точки зрения, так и подтвержденной многочисленными экспериментальными данными [15, 72]. Известно, что вирусная инфекция, взаимодействуя с TLR рецепторами, экспрессирующихся на плазматцитоидных ДК в составе КВИ, является мощным стимулом активации последних и продукции ими провоспалительных цитокинов — IFN I типа, TNF α , TNF β IL- β и др., мобилизации CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов и других клеток воспалитель-

ного инфильтрата. Подобный механизм изучен в отношении вирусов Эпштейна–Барр, кори, парвовируса B19 при РА, СКВ, синдроме Шегрена, дерматомиозита [117, 147].

Ассоциации с МНС I и II класса при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

Маркерами активации клеток макрофагально-моноцитарного ряда, дендритных клеток различного гистогенеза, а также эндотелиоцитов в составе КВИ является экспрессия аллелей МНС II класса — HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ. Иммунологический смысл этой активации заключается в том, что клетки указанного гистогенеза могут участвовать в межклеточных контактах и выполнять функции АПК *in situ*. Известно, что аллельные варианты МНС-II класса экспрессируются на синовиоцитах суставов при РА, на клетках тубулярного эпителия почек при СКВ и подобная эктопическая экспрессия аллелей МНС II класса свидетельствует о разгаре аутоиммунных процессов. Как неоднократно указывалось, клеточный состав КВИ, его организация вплоть до формирования фолликулоподобных лимфоидных структур, васкуляризация локуса воспаления, продукция и рецепция цито- хемокинов создают условия для индукции иммунного (аутоиммунного) ответа *in situ*, в том числе и за счет феномена перекрестной презентации. Если говорить с общепатологических позиций, то количественный и качественный состав КВИ, наличие фолликулоподобных лимфоидных структур, наличие ГЗТ-гранулем, интенсивная васкуляризация локуса воспаления при ревматических заболеваниях отвечают необходимым условиям индукции иммунного ответа на любой антигенный триггер *in situ*. В принципе аналогичные условия создаются в лимфоидных органах при индукции АГ-специфического иммунного ответа. Таким образом реализуется общепатологический принцип по И.В. Давыдовскому «иммуногенез через болезнь» [4].

Результаты многочисленных работ по ассоциациям аллелей и гаплотипов МНС-II класса, а также МНС-I класса, с ИВРС позволяют обосновать возможность индукции иммунного ответа в месте локализации КВИ на эндогенные АГ детерминанты в составе тех аллелей МНС-II класса, с которыми определена статистически значимая ассоциация при популяционно-иммуногенетических исследованиях. Так, показана статистически значимая ассоциация аллелей локуса HLA-DRB1 с РА. Генотип этого локуса HLA-DRB1*0401/*0404 при РА ассоциирован с повышенным риском заболевания, ранним на-

чалом, серопозитивностью, выраженным поражением суставов и наличием ревматоидных узелков. Молекулярная основа подобной ассоциации обусловлена тем, что последовательность пяти аминокислот в позиции 70-74 β-цепи HLA-DR формирует щель, связывающую в том числе и ауто-АГ синовиальной оболочки. В результате Мф и ДК, на которых экспрессируется указанный генотип, осуществляют АГ-презентирующую функцию с последующим аутоиммунным ответом на собственные АГ-детерминанты синовиоцитов [58, 142].

С подобных позиций можно обосновать ассоциацию аллеля HLA-DRB1*0405 с РА в азиатской популяции и аллеля HLA-DRB1*1402 у коренных американцев. Интересно, что генотип HLA-DRB1*13:01 в европейской популяции ассоциирован с устойчивостью к действию анти-цитруллиновых ауто-АТ, имеющих большое значение в индукции аутоиммунного ответа при РА, о чем говорилось выше [164].

У больных РА с наличием сывороточного ревматоидного фактора и прогрессирующей деструкцией суставного хряща определяется, по литературным данным, статистически значимая ассоциация с аллелем HLA-DRB1*0401, в то время как ассоциации с аллелями HLA-DRB1*0404 и B1*0101 определяются у серонегативных больных РА с более легким течением болезни. Аллели МНС II класса, такие как HLA-DR3 (DRB1*0301) and HLA-DR2 (DRB1*1501) статистически значимо ассоциированы с СКВ у лиц европеоидной популяции. В других исследованиях на европейской популяции с СКВ определены ассоциации гаплотипов МНС II класса, таких как DRB1*1501/DQB1*0602, DRB1*0301/DQB1*0201 и DRB1*0801/DQB1*0402. При системной склерозе (СС) статистически значимые ассоциации определены с аллелями МНС II класса – HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*11 и аллелями МНС I класса – HLA-A*30 и HLA-A*32. При синдроме Шегрена ассоциации определяются с аллелями МНС II класса – HLA-DRB1*15:01 и HLA-DRB1*03:01, а также с аллелями МНС I класса HLA-B*008, HLA-A*024.

Представленные некоторые результаты по популяционно-иммуногенетическим исследованиям иллюстрируют участие АПК в составе КВИ, экспрессирующих конкретную комбинацию аллелей МНС I и II классов, при ИВРЗ. Указанные аллельные варианты МНС, в соответствии с особенностями молекулярной организации (аминокислотная последовательность, вторичная структура полипептидной цепи, сте-

реохимическая организация), комплементарны процессированным продуктам дезорганизации соединительной ткани, что позволяет Мф и ДК презентировать ауто-АГ в составе аллелей МНС I и II класса CD4⁺ и CD8⁺ клеткам с последующей индукцией аутоиммунного ответа. Подобный подход определяет молекулярно-клеточную основу при интерпретации феномена наследственной предрасположенности при ревматических заболеваниях в рамках модели МНС-рестрикции [55].

Заключение

Формирование КВИ – ключевое патогенетическое звено ИВРЗ. КВИ является динамичной структурой, отражающей этапность, рецидивирующее течение и исход ИВРЗ. В процессе хронического воспаления КВИ приобретает разные морфологически идентифицируемые формы. Организованными формами КВИ при ИВРЗ являются фолликулоподобные структуры (лимфоидный неогенез), ГЗТ-гранулемы, неорганизованными формами – диффузный клеточный воспалительный инфильтрат.

Фолликулоподобные структуры и ГЗТ-гранулемы имеют морфо-функциональное сходство с периферическими органами иммунной системы – лимфатическими узлами, пейеровыми бляшками, селезенкой, что создает возможность индукции иммунного ответа на ауто-АГ в очаге воспаления (*locus morbi*).

Та или иная форма КВИ является отражением конкретного этапа иммуновоспалительного процесса. Плацдармом формирования КВИ при ревматических заболеваниях является рыхлая волокнистая неоформленная соединительная ткань. Состояние реактивности этой ткани и гистогенетически близких структур, состав активированных клеток воспалительного инфильтрата, состояние межклеточного матрикса формируют микроокружение, благоприятствующее для индукции АГ-специфического иммунного ответа на ауто-АГ *in situ*. Активация клеток макрофагально-моноцитарного ряда, дендритных клеток, Т- и В-лимфоцитов, тесный межклеточный контакт между ними создают условия для АГ-презентации, формирования иммунологического синапса (аллели МНС II класса – TCR-CD4⁺ или аллели МНС I класса – TCR-CD8⁺), экспрессии костимуляторных молекул CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) на АПК, CD28 на Т-хелперах, CD40 на В-лимфоцитах и генерации ауто-АТ или сенсibilизированных Т-лимфоцитов. Разволокнение коллагенового и эластического каркаса, дезор-

ганизация основного вещества соединительной ткани, усиление фагоцитарной активности в отношении образовавшегося тканевого детрита, а также в отношении некротически и некробиотически измененных клеток, обуславливают цитоплазматический ограниченный протеолиз фагоцитированного материала и презентацию процессированных продуктов в составе аллелей МНС I и II классов CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитам. Фактором усиления ауто-АГ свойств клеточного и тканевого детрита является гиперцитрулинизация полипептидов, усиливающих цитолитический потенциал CD8⁺ лимфоцитов.

Функцию презентации антигенного материала выполняют находящиеся в избытке в составе КВИ Мф, ДК, а также В-лимфоциты, экспрессирующие молекулы МНС I и II класса, а также костимулирующие молекулы. Избыток всего спектра провоспалительных хемо- и цитокинов, продуцируемых в том числе и самими клетками воспалительного инфильтрата, вносит дополнительный вклад в усиление фагоцитарной активности Мф и ДК, экспрессии костимуляторных молекул на АПК, экспрессии TLR-рецепторов, увеличение васкуляризации и эндотелиальной реакции на воспаление, усиление адгезионных межклеточных взаимодействий. Плазматизация лимфоидной ткани, столь свойственная ИВРЗ, является отражением активности В-лимфоцитов как в качестве АПК, так и в качестве клеток-предшественников плазматических клеток — продуцентов ауто-АТ. Этот этап можно рассматривать как момент запуска клеточного и гуморального иммунного ответа на ауто-АГ. Отметим, что во всех описанных процессах четко определяются и процессы пролиферации клеток макрофагально-моноцитарного ряда и лимфоидных клеток.

Тесная взаимосвязь и взаимозависимость между врожденным и адаптивным иммунитетом при ИВРЗ — хорошо документированный факт. В роли кандидатных триггеров ИВРЗ выступают широко распространенные вирусы, а также ряд факторов риска, известных для группы мультифакториальных заболеваний. Особое место в ряду факторов риска отводится иммуногенетическим факторам, а именно ассоцииро-

ванным с конкретными ревматическими заболеваниями аллелей МНС I и II класса. Эти факты вполне объяснимы, поскольку индивидуальное носительство определенных аллелей МНС I и II класса, их конформационное состояние, стереохимическая комплементарность ауто-антигенов АГ-связывающим щелям аллелей МНС I и II класса детерминирует индукцию клеточного или гуморального иммунного ответа на ауто-АГ хозяина. Комбинаторика аллелей МНС также в определенной степени определяет ответ и на медикаментозную терапию.

В ответе на ауто-АГ задействованы все известные на сегодняшний день механизмы врожденного и адаптивного иммунитета. При интерпретации иммунопатогенеза ревматических заболеваний и формирования КВИ применяются все модели и схемы из области фундаментальной иммунологии. Прежде всего, это модель МНС-рестрикции, модель молекулярной мимикрии, или перекрестной (кросс) АГ-презентации, модель срыва центральной или периферической толерантности к ауто-АГ, модель кандидатных «триггеров» аутоиммунных и аутовоспалительных процессов, модель ассоциаций аллелей МНС I и II классов с конкретными, нозологически уникальными, ревматическими заболеваниями. Обоснованность подобного подхода подтверждается разработкой на этой платформе многочисленных генно-инженерных иммуноотропных противовоспалительных препаратов, обладающих статистически значимыми лечебными эффектами.

Патогенетическое значение КВИ не исчерпывается интерпретацией клеточно-молекулярных процессов, лежащих в основе формирования КВИ. Понимание общепатологических и иммунологических закономерностей ХПВ является основой нозологической классификации ИВРЗ. В ревматологии известны многие перекрестные синдромы, имеющие «размытые» диагностические критерии. Актуальность дальнейшего изучения всех аспектов ХВП при ИВРЗ очевидна, не менее очевидна и востребованность подобных знаний в сфере практической медицины.

Список литературы / References

1. Адо А.А. Патифизиология фагоцитов (краткий очерк истории и современного состояния учения о фагоцитозе). М.: Медгиз, 1961. 295 с. [Ado A.A. Phatophysiology of phagocytes (a brief outline of the history and modern state of the doctrine of phagocytosis). Moscow: Medgiz, 1961. 295 p.]
2. Богомолец А.А. Избранные труды в трех томах. Киев: Издательство Академии наук УССР, 1957. Т. 2. С. 312-323. [Bogomolets A.A. Selected works in three volumes. Publishing house of the Academy of Sciences of the USSR]. Kiev: Publishing House of the Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, 1957, Vol. 2, pp. 312-323.

3. Воспаление. Руководство для врачей. Под ред. В.В. Струкова, В.С. Паукова. М.: Медицина, 1995. С. 219. [Inflammation. A guide for doctors. Ed. V.V. Strukov, V.S. Paukov]. Moscow: Medicine, 1995. p. 219.
4. Давыдовский И.В. Общая патология человека. М.: Медицина, 1969. С. 425, 317. [Davidovskiy I.V. General pathology of a human]. Moscow: Medicine, 1969, pp. 425, 317.
5. Кумар А., Аббас А.К., Фаусто А. Основы патологии заболеваний по Роббинсу и Котрану. М.: Логосфера, 2016. Т. 2, 3. [Kumar V., Abbas A.K., Fausto N. Robbins and cotran pathologic basis of disease]. Moscow: Logosphere, 2016, Vol. 2, 3.
6. Маянский Д.Н. Хроническое воспаление. М.: Медицина, 1991. С. 24. [Mayanskiy D.N. Chronic inflammation]. Moscow: Medicine, 1991, p. 24.
7. Мечников И.И. Лекции о сравнительной патологии воспаления. М.: АН СССР, 1954. 267 с. [Mechnikov I.I. Lectures on the comparative pathology of inflammation]. Moscow: USSR Academy of Sciences, 1954. 267 p.
8. Насонов Е.Л., Авдеева А.С. Иммуновоспалительные ревматические заболевания, связанные с интерфероном типа I: новые данные // Научно-практическая ревматология, 2019. Т. 57, № 4. С. 452-461. [Nasonov E.L., Avdeeva A.S. Immunoinflammatory rheumatic diseases associated with type I interferon: New evidence. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2019, Vol. 57, no. 4, pp. 452-461. (In Russ.)]
9. Раденска-Лоповок С.Г. Иммуноморфологическая характеристика синовиальной оболочки при ревматических заболеваниях // Архив патологии, 2016. № 4. С. 64-68. [Radenska-Lopovok S.G. Immunomorphological characteristics of the synovial membrane in rheumatic diseases. *Arkhiv patologii = Archive of Pathology*, 2016, no. 4, pp. 64-68. (In Russ.)]
10. Саидов М.З., Насонова В.А., Османов А.О., Мамаев И.А., Раденска-Лоповок С.Г., Насонов Е.Л. Иммунофенотипирование клеток воспалительного инфильтрата при ревматоидных синовитах // Иммунология, 2002. Т. 23, № 1. С. 18-22. [Saidov M.Z., Nasonova V.A., Osmanov A.O., Mamaev I.A., Radenska-Lopovok S.G., Nasonov E.L. Immunophenotyping of inflammatory infiltrate cells with rheumatoid synovitis. *Immunologiya = Immunologyia*, 2002, Vol. 23, no. 1, pp. 18-22. (In Russ.)]
11. Саидов М.З., Насонова В.А., Османов А.О., Мамаев И.А., Раденска-Лоповок С.Г., Насонов Е.Л. Иммуногистохимическое изучение клеток воспалительного инфильтрата при дерматомиозите // Иммунология, 2002. Т. 23, № 3. С. 147-152. [Saidov M.Z., Nasonova V.A., Osmanov A.O., Mamaev I.A., Radenska-Lopovok S.G., Nasonov E.L. Immunohistochemical study of inflammatory infiltrate cells in dermatomyositis. *Immunologiya = Immunologyia*, 2002, Vol. 23, no. 3, pp. 147-152. (In Russ.)]
12. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. М., Медицина, 1981. 312 с. [Sеров V.V., Shechter A.B. Connecting tissue]. Moscow: Medicine, 1981. 312 p.
13. Струков А.И., Бегларян А.Г. Патологическая анатомия и патогенез коллагеновых болезней. М.: Медгиз, 1963. 323 с. [Strukov A.I., Beglarian A.G. Pathological anatomy and pathogenesis of collagen diseases]. Moscow: Medgiz, 1963. 323 p.
14. Эйнгрон А.Г. Патологическая анатомия и патологическая физиология. М.: Медицина, 1983. 304 с. [Eingron A.G. Pathological anatomy and pathological physiology]. Moscow: Medicine, 1983. 304 p.
15. Alam J., Yong C.K., Choi Y. Potential role of bacterial infection in autoimmune diseases: a new aspect of molecular mimicry. *Immune Netw.*, 2014, Vol. 14, no. 1, pp. 7-13.
16. Alsina L., Israelsson E., Altman M.C., Dang K.K., Ghandil P., Chaussabel D. A narrow repertoire of transcriptional modules responsive to pyogenic bacteria is impaired in patients carrying loss-of-function mutations in MYD88 or IRAK4. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 12, pp. 1134-1142.
17. Angiolillo A.L., Kanegane H., Sgadari C., Reaman G.H., Tosato G. Interleukin-15 promotes angiogenesis *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 1997, Vol. 233, no. 1, pp. 231-237.
18. Arai M., Ikawa Y., Chujo S., Hamaguchi Y., Ishida W., Hasegawa M., Mukaida N., Fujimoto M., Takehara K. Chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 regulate skin fibrosis in the mouse model of cytokine-induced systemic sclerosis. *J. Dermatol. Sci.*, 2013, Vol. 69, no. 3, pp. 250-258.
19. Auerbach W., Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmac. Ther.*, 1994, Vol. 63, no. 3, pp. 265-311.
20. Bachem A., Hartung E., Guttler S., Mora A., Zhou X., Hegemann A., Plantinga M., Mazzini E., Stoitzner P., Gurka S., Henn V., Mages H.W., Kroczeck A. Expression of XCR1 characterizes the Batf3-dependent lineage of dendritic cells capable of antigen cross-presentation. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 214. doi: 10.3389/fimmu.2012.00214.
21. Banchereau J., Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity*, 2006, Vol. 25, no. 3, pp. 383-392.
22. Banchereau R., Cepika A.M., Banchereau J., Pascual V. Understanding human autoimmunity and autoinflammation through transcriptomics. *Annu. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 35, pp. 337-370.

23. Barkauskaite V., Ek M., Popovic K., Harris H.E., Wahren-Herlenius M., Nyberg F. Translocation of the novel cytokine HMGB1 to the cytoplasm and extracellular space coincides with the peak of clinical activity in experimentally UV-induced lesions of cutaneous lupus erythematosus. *Lupus*, 2007, Vol. 16, no. 10, pp. 794-802.
24. Baumann I., Kolowos W., Voll R.E., Manger B., Gaipf U., Neuhuber W.L. Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 2002, Vol. 46, no. 1, pp. 191-201.
25. Blanco P., Palucka A.K., Gill M., Pascual V., Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science*, 2001, Vol. 294, pp. 1540-1543.
26. Blander J.M. Regulation of the cell biology of antigen cross-presentation. *Annu. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 36, pp. 717-753.
27. Blissett A.R., Garbellini D., Calomeni E.P., Mihai C., Elton T.S., Agarwal G. Regulation of collagen fibrillogenesis by cell-surface expression of kinase dead DDR2. *J. Mol. Biol.*, 2009, Vol. 385, 902-911.
28. Blokland S.L.M., Hillen M.R., Kruize A.A., Meller S., Homey B., Smithson G.M., Radstake T.R.D.J., van Roon J. Increased CCL25 and T helper cells expressing CCR9 in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome: potential new axis in lymphoid neogenesis. *Arthr. Rheumatol.*, 2017, Vol. 69, no. 10, pp. 2038-2051.
29. Braga T.T., Agudelo J.S., Camara N.O. Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe. *Front Immunol.*, 2015, Vol. 6, 602. doi: 10.3389/fimmu.2015.00602.
30. Breitfeld D., Ohl L., Kremmer E., Ellwart J., Sallusto F., Lipp M., Forster R. Follicular B helper T cells express CXCR chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 11, pp. 1545-1552.
31. Bresnahan B., Pontifex E., Thurlings R.M., Vinkenoog M., Gabalawy H., Fearon U., Fitzgerald O., Gerlag D.M., Rooney T., van de Sande M.G., Veale D., Vos K., Tak P.-P. Synovial tissue sublining CD68 expression is a biomarker of therapeutic response in rheumatoid arthritis clinical trials: consistency across centers. *J. Rheumatol.*, 2009, Vol. 36, no. 8, pp. 1800-1802.
32. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, Vol. 303, pp. 1532-1535.
33. Burrage P.S., Mix K.S., Brinckerhoff C.E. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci.*, 2006, Vol. 11, no. 1, pp. 529-543.
34. Canna S.W., de Jesus A.A., Gouni S., Brooks S.R., Marrero B., Liu Y., DiMattia M.A., Zaal K.J.M., Montealegre Sanchez G.A., Kim H., Chapelle D., Plass N., Huang Y., Villarino A.V., Biancotto A., Fleisher T.A., Duncan J.A., O'Shea J.J., Benseler S., Grom A., Deng Z., Laxer R.M., Golbdach-Mansky R. An activating NLRP4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. *Nat. Genet.*, 2014, Vol. 46, no. 10, pp. 1140-1146.
35. Carmona-Rivera C., Zhao W., Yalavarthi S., Kaplan M.J. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann. Rheum. Dis.*, 2015, Vol. 74, no. 7, pp. 1417-1424.
36. Carulli M. T., Ong V.H., Ponticos M., Shiwen X., Abraham D.J., Black C.V., Denton C.P. Chemokine receptor CCR2 expression by systemic sclerosis fibroblasts: evidence for autocrine regulation of myofibroblast differentiation. *Arthritis Rheum.*, 2005, Vol. 52, no. 12, pp. 3772-3782.
37. Casciola-Rosen L.A., Anhalt G., Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.*, 1994, Vol. 179, no. 4, pp. 1317-1330.
38. Chang A., Henderson S.G., Brandt D., Liu N., Guttikonda R., Hsieh C., Kaverina N., Utset T.O., Meehan S.M., Quigg R.J., Meffre E., Clark R. *In situ* B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 3, pp. 1849-1860.
39. Christensen S.R., Shupe J., Nickerson K., Kashgarian M., Flavell R.A., Shlomchik M.J. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity*, 2006, Vol. 25, no. 3, pp. 417-428.
40. Crawford Y., Kasman I., Yu L., Zhong C., Wu X., Modrusan Z., Kaminker J., Ferrara N. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell*, 2009, Vol. 15, no. 1, pp. 21-34.
41. Crosby J.R., Tappan K.A., Seifert R.A., Bowen-Pope D.F. Chimera analysis reveals that fibroblasts and endothelial cells require platelet-derived growth factor receptor-beta expression for participation in reactive connective tissue formation in adults but not during development. *Am. J. Pathol.*, 1999, Vol. 154, pp. 131-1321.
42. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 29, pp. 621-663.
43. Crow Y.J. Type I interferonopathies: a novel set of inborn errors of immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2011, Vol. 1238, no. 1, pp. 91-98.
44. Darrah E., Rosen A. Granzyme B cleavage of autoantigens in autoimmunity. *Cell Death Differ.*, 2010, Vol. 17, no. 4, pp. 624-632.

45. De Paepe B., Creus K.K., De Bleecker J.L. Chemokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Front. Biosci.*, 2008, Vol. 13, pp. 2548-2577.
46. De Paepe B., Creus K. K., De Bleecker J. L. Role of cytokines and chemokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2009, Vol. 21, no. 6, pp. 610-616.
47. Decker P., Kotter I., Klein R., Berner B., Rammensee H.G. Monocyte-derived dendritic cells over-express CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 2006, Vol. 45, no. 9, pp. 1087-1095.
48. Dennis G. Jr., Holweg C.T., Kummerfeld S.K., Choy D.F., Setiadi A.F., Hackney J.A., Haverty P.M., Gilbert H., Lin W.Y., Diehl L., Fischer S., Song A., Musselman D., Klearman M., Gabay C., Kavanaugh A., Endres J., Fox D.A., Martin F., Townsend M. Synovial phenotypes in rheumatoid arthritis correlate with response to biologic therapeutics. *Arthr. Res. Ther.*, 2014, Vol. 16, no. 2, R90. doi: 10.1186/ar4555.
49. Dieguez-Gonzalez R., Calaza M., Perez-Pampin E. Association of interferon regulatory factor 5 haplotypes, similar to that found in systemic lupus erythematosus, in a large subgroup of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, no. 5, pp. 1264-1274.
50. Doster R.S., Rogers L.M., Gaddy J.A., Aronoff D.M. Macrophage Extracellular Traps: A Scoping Review. *J. Innate Immun.*, 2017, Vol. 10, no. 1, pp. 3-13.
51. Ek M., Popovic K., Harris H.E., Naucner C.S., Wahren-Herlenius M. Increased extracellular levels of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 2006, Vol. 54, no. 7, pp. 2289-2294.
52. Eming S.A., Wynn T.A., Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science*, 2017, Vol. 356, pp. 1026-1030.
53. Fang C., Luo T., Lin, L. The correlational research among serum CXCL13 levels, circulating plasmablasts and memory B cells in patients with systemic lupus erythematosus: a STROBE-compliant article. *Medicine*, 2017, Vol. 96, no. 48, e8675. doi: 10.1097/MD.00000000000008675.
54. Feng D., Sangster-Guity N., Stone R., Korczeniewska J., Mancl M.E., Fitzgerald-Bocarsly P., Barnes B.J. Differential requirement of histone acetylase and deacetylase activities for IRF5-mediated proinflammatory cytokine expression. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 10, pp. 6003-6012.
55. Fernando M.A., Stevens C.R., Walsh E.C., Jager F., Goyette P., Plenge R., Vyse T., Rioux J. Defining the role of the mhc in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet.*, Vol. 4, no. 4, e1000024. doi:10.1371/journal.pgen.1000024.
56. Firestein G.S. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum.*, 1996, Vol. 39, no. 11, pp. 1781-1790.
57. Garcia-Romo G.S., Caielli S., Vega B., Connolly J., Allantaz F., Xu Z., Punaro M., Baisch J., Guiducci C., Coffman R.L., Barrat F.J., Banchereau J., Pascual V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2011, Vol. 3, Iss. 73, 73ra20. doi: 10.1126/scitranslmed.3001201.
58. Gregersen P.K., Silver J., Winchester R.J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1987, Vol. 30, no. 11, pp. 1205-1213.
59. Griffith J.W., Sokol C.L., Luster A.D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 32, pp. 659-702.
60. Gross H., Hennard C., Masouris I., Cassel C., Barth S. Binding of the heterogeneous ribonucleoprotein K (hnRNP K) to the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) enhances viral LMP2A expression. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 8, e42106. doi: 10.1371/journal.pone.0042106.
61. Gupta A.K., Joshi M.B., Philippova M., Erne P., Hasler P., Hahn S., Resink T.J. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.*, 2010, Vol. 584, pp. 3193-3197.
62. Hase K., Tani K., Shimizu T., Ohmoto Y., Matsushima K., Sone S. Increased CCR4 expression in active systemic Lupus erythematosus. *J. Leukocyte Biol.*, 2001, Vol. 70, no. 5, pp. 749-755.
63. Helming L., Gordon S. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends Cell Biol.*, 2009, Vol. 19, no. 5, pp. 514-522.
64. Hernandez-Molina G., Michel-Peregrina M., Hernandez-Ramirez D.F., Sanchez-Guerrero J., Llorente L. Chemokine saliva levels in patients with primary Sjogren's syndrome, associated Sjogren's syndrome, pre-clinical Sjogren's syndrome and systemic autoimmune diseases. *Rheumatology*, 2011, Vol. 50, no. 7, pp. 1288-1292.
65. Herrmann M., Voll R.E., Zoller O.M., Hagenhofer M., Ponner B.B., Kalden J.R. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 1998, Vol. 41, no. 7, pp. 1241-1250.
66. Higashi-Kuwata N., Makino T., Inoue Y., Takeya M., Ihn H. Alternatively activated macrophages (M2 macrophages) in the skin of patient with localized scleroderma. *Exp. Dermatol.*, 2009, Vol. 18, no. 8, pp. 727-729.
67. Higgs B.W., Liu Z., White B., Zhu W., White W., Morehouse C., Brohawn P., Kiener P.A., Richman L., Fiorentino D., Greenberg S.A., Jallal B., Yao Y. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid

arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann. Rheum. Dis.*, 2011, Vol. 70, no. 11, pp. 2029-2036.

68. Hjelmström P. Lymphoid neogenesis – *de novo* formation of lymphoid tissue in chronic inflammation through expression of homing chemokines. *J. Leuk. Biol.*, 2001, Vol. 69, pp. 331-339.

69. Hjelmström P., Fjell J., Nakagawa T., Sacca R., Cuff C.A., Ruddle N.H. Lymphoid tissue homing chemokines are expressed in chronic inflammation. *Am. J. Pathol.*, 2000, Vol. 156, no. 4, pp. 1133-1138.

70. Horikawa S., Ishii Y., Hamashima T., Yamamoto S., Mori H., Fujimori T., Shen J., Inoue R., Nishizono H., Itoh H., Majima M., Abraham D., Miyawaki T., Sasahara M. PDGFR α plays a crucial role in connective tissue remodeling. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 17948. doi: 10.1038/srep17948.

71. Humby F., Bombardieri M., Manzo A., Kelly S., Blades M.C., Kirkham B. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med.*, 2009, Vol. 6, e1. doi: 10.1371/journal.pmed.0060001.

72. Jara L.J., Medina G., Saavedra M.A. Autoimmune manifestations of infections. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2018, Vol. 30, no. 46, pp. 373-379.

73. Jego G., Palucka A.K., Blanck J.P., Chalouni C., Pascual V., Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*, 2003, Vol. 19, no. 2, pp. 225-234.

74. Jenkins M.K., Khoruts A., Ingulli E., Mueller D.L., McSorley S.J., Reinhardt R., Itano A., Pape A. *In vivo* activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, Vol. 19, pp. 23-45.

75. Jesus A.A., Goldbach-Mansky R. IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes. *Annu. Rev. Med.*, 2014, Vol. 65, pp. 223-244.

76. Jorch S., Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.*, 2017, Vol. 23, no. 3, pp. 279-287.

77. Jurewicz M.M., Stern L.G. Class II MHC antigen processing in immune tolerance and inflammation. *Immunogenetics*, 2019, Vol. 71, no. 3, pp. 171-187.

78. Kang Y.M., Zhang X., Wagner U. G. Yang H., Beckenbaugh R.D., Kurtin P.J., Goronzy J.J., Weyand C.M. CD8 T Cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, no. 10, pp. 1325-1336.

79. Khandpur R., Carmona-Rivera C., Vivekanandan-Giri A., Gizinski A., Yalavarthi S., Knight J.S. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 178, 178ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.3005580.

80. Kiselyov A., Balakin K.V., Tkachenko S.E. VEGF/VEGFR signaling as a target for inhibiting angiogenesis. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2007, Vol. 16, pp. 83-107.

81. Klemperer P. The concept of collagen diseases. *Am. J. Pathol.*, 1950, Vol. XXVI, no. 4, pp. 505-519.

82. Knecht H., Saremaslani P., Hedinger C. Immunohistological findings in Hashimoto's thyroiditis, focal lymphocytic thyroiditis and thyroiditis de Quervain. *Virchows Arch. A*, 1981, Vol. 393, pp. 215-231.

83. Knight J.S., Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. 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.

84. Kobayashi K., Kaneda K., Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc. Res. Tech.*, 2001, Vol. 53, no. 4, pp. 241-245.

85. Koch A.E. Angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1998, Vol. 41, no. 6, pp. 951-962.

86. Koelink P.J., Overbeek S.A., Braber S., Henricks P.A., Roda M.A., Verspaget H.W., Wolfkamp S.C., te Velde A.A., Jones C.W., Jackson P.L., Blalock J.E., Sparidans R.W., Kruijtz J.A.W., Garssen J., Folkerts G., Kraneveld A.D. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: a vicious circle in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2014, Vol. 63, no. 4, pp. 578-587.

87. Kraan M.C., Haringman J.J., Post W.J., Versendaal J., Breedveld F.C., Tak P.P. Immunohistological analysis of synovial tissue for differential diagnosis in early arthritis. *Rheumatology*, 1999, Vol. 38, no. 11, pp. 1074-1080.

88. Krenn V., Souto-Carneiro M.M., Kim H.J., Berek C., Starostik P., König A. Histopathology and molecular pathology of synovial B-lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Histol. Histopathol.*, 2000, Vol. 15, pp. 791-798.

89. Kroenke M.A., Eto D., Locci M., Cho M., Davidson T., Haddad E.K., Crotty S. Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4T cell differentiation. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 8, pp. 3734-3744.

90. Kuivaniemi H., Tromp G. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*, 2019, Vol. 707, pp. 151-171.

91. Kunnumakkara A.B., Sailo B.L., Banik K., Harsha C., Prasad S., Gupta S.C., Bharti A.C., Aggarwal B.B. Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked? *J. Transl. Med.*, 2018, Vol. 16, 14. doi: 10.1186/s12967-018-1381-2.

92. Lande R., Gregorio J., Facchinetti V., Chatterjee B., Wang Y.H., Homey B., Cao W., Wang Y.-H., Su B., Nestle F.O., Zal T., Mellman I., Schröder J.-M., Liu Y.-J., Gillet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 2007, Vol. 449, pp. 564-569.
93. Lau C.M., Broughton C., Tabor A.S., Akira S., Flavell R.A., Mamula M., Christensen S.R., Shlomchik M.J., Viglianti G.A., Rifkin I.R., Marshak-Rothstein A. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 202, no. 9, pp. 1171-1177.
94. Leadbetter E.A., Rifkin I.R., Hohlbaum A.M., Beaudette B.C., Shlomchik M.J., Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, 2002, Vol. 416, pp. 603-607.
95. Liao A.P., Salajegheh M., Nazareno R., Kagan J.C., Jubin R.G., Greenberg S.A. Interferon β is associated with type 1 interferon-inducible gene expression in dermatomyositis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2011, Vol. 70, no. 5, pp. 831-836.
96. Loo J., Spittle D.A., Newnham M. COVID-19, immunothrombosis and venous thromboembolism: biological mechanisms. *Thorax*, 2021, Vol. 76, no. 4, pp. 412-420.
97. Ma W.-T., Gao F., Gu K., Chen D.-K. The Role of Monocytes and Macrophages in autoimmune diseases: a comprehensive review. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1140. doi: 10.3389/fimmu.2019.01140.
98. Malmstrom V., Venalis P., Albrecht I. T cells in myositis. *Arthritis Res. Ther.*, 2012, Vol. 14, no. 6, 230. doi.org/10.1186/ar4116.
99. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, 2002, Vol. 23, no. 11, pp. 549-555.
100. Manzo A., Bombardieri M., Humby F., Pitzalis C. Secondary and ectopic lymphoid tissue responses in rheumatoid arthritis: from inflammation to autoimmunity and tissue damage/remodeling. *Immunol. Rev.*, 2010, Vol. 233, pp. 267-285.
101. Masters S.L., Simon A., Aksentijevich I., Kastner D.L. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 27, pp. 621-668.
102. McNally A.K., Anderson J.M. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am. J. Pathol.*, 1995, Vol. 147, no. 5, pp. 1487-1499.
103. McNally A.K., Jones J.A., Macewan S.R., Colton E., Anderson J.M. Vitronectin is a critical protein adhesion substrate for IL-4-induced foreign body giant cell formation. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2008, Vol. 86, no. 2, pp. 535-543.
104. Means T.K., Latz E., Hayashi F., Murali M.R., Golenbock D.T., Luster A.D. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.*, 2005, Vol. 115, no. 2, pp. 407-417.
105. Miga A., Masters S., Gonzalez M., Noelle R.J. The role of CD40-CD154 interactions in the regulation of cell mediated immunity. *Immunol. Investig.*, 2000, Vol. 29, no 2, pp. 111-114.
106. Miyabe Y., Lian J., Miyabe C., Luster A.D. Chemokines in rheumatic diseases: pathogenic role and therapeutic implications. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2019, Vol. 15, pp. 731-746.
107. Moghaddas F., Masters S.L. Monogenic autoinflammatory diseases: cytokinopathies. *Cytokine*, 2015, Vol. 74, no. 2, pp. 237-246.
108. Moore B.B., Keane M.P., Addison C.L., Arenberg D.A., Strieter R.M. CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family. *J. Invest. Med.*, 1998, Vol. 46, no. 4, pp. 113-120.
109. Murphy G., Knauper V., Atkinson S., Butler G., English W., Hutton M., Stracke J., Clark I. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res.*, 2002, Vol. 4, Suppl. 3, pp. S39-S49.
110. Murshid A., Gong J., Calderwood S.K. The role of heat shock proteins in antigen cross presentation. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 63. doi: 10.3389/fimmu.2012.00063.
111. Nakhasi H.L., Ramanujam M., Atreya C.D., Hobman T.C., Lee N. Rubella virus glycoprotein interaction with the endoplasmic reticulum calreticulin and calnexin. *Arch. Virol.*, 2001, Vol. 146, pp. 1-14.
112. Nanki T., Hayashida K., El-Gabalawy H., Suson S., Shi K., Girschick H.J., Yavus S., Lipsky P.E. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4⁺ T-cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 165, no. 11, pp. 6590-6598.
113. Nanki T., Shimaoka T., Hayashida K., Taniguchi K., Yonehara S., Miyasaka N. Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2005, Vol. 52, no. 10, pp. 3004-3014.
114. Ohtani H. Granuloma cells in chronic inflammation express CD205 (DEC205) antigen and harbor proliferating T lymphocytes: Similarity to antigen-presenting cells. *Pathol. Int.*, 2013, Vol. 63, pp. 85-93.
115. Orr C., Najm A., Biniecka M., McGarry T., Ng C.T., Young F., Fearon U., Veale D.J. Synovial immunophenotype and anti-citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis patients: relationship to treatment response and radiologic prognosis. *Arthr. Rheumatol.*, 2017, Vol. 69, no. 11, pp. 2114-2123.
116. Pagan A.J., Ramakrishnan L. The Formation and Function of Granulomas. *Annu. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 36, pp. 639-665.

117. Page C., François C., Goëb V., Duverlie G. Human parvovirus B19 and autoimmune diseases. Review of the literature and pathophysiological hypotheses. *J. Clin. Virol.*, 2015, Vol. 72, pp. 69-74.
118. Pap T., Shigeyama Y., Kuchen S., Fernihough J.K., Simmen B., Gay R.E. Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2000, Vol. 43, no. 6, pp. 1226-1232.
119. Patel D.D., Zachariah J.P., Whichard L.P. CXCR3 and CCR5 ligands in the rheumatoid arthritis synovium. *Clin. Immunol.*, 2001, Vol. 98, no. 1, pp. 39-45.
120. Pisetsky D.S., Erlandsson-Harris H., Andersson U. High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Res. Ther.*, 2008, Vol. 10, 209. doi:10.1186/ar2440.
121. Pitzalis C., Kelly S., Humby F. New learnings on the pathophysiology of RA from synovial biopsies. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2013, Vol. 25, no. 3, pp. 334-344.
122. Randen I., Mellbye O.J., Forre O., Natvig J.B. The identification of germinal centres and follicular dendritic cell networks in rheumatoid synovial tissue. *Scand. J. Immunol.*, 1995, Vol. 41, no. 5, pp. 481-486.
123. Raychaudhuri S., Sandor C., Stahl E.A., Freudenberg J., Lee H.S., Jia X., Alfredsson L., Padyukov L., Klareskog L., Worthington J., Siminovitch K.A., Bae S.-C., Plenge R.M., Gregersen P.K., de Bakker P.I. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.*, 2012, Vol. 44, no. 3, pp. 291-296.
124. Reglero-Real N., Colom B., Bodkin J.V., Nourshargh S. Endothelial cell junctional adhesion molecules: role and regulation of expression in inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2016, Vol. 36, no. 10, pp. 2048-2057.
125. Rizzo C., Grasso G., Castaniti G., Ciccio F., Guggino G. Primary sjogren syndrome: focus on innate immune cells and inflammation. *Vaccines*, 2020, Vol. 8, no. 2, pp. 1-23.
126. Rock K.L., Kono H. The Inflammatory Response to Cell Death. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2008, Vol. 3, pp. 99-126.
127. Rogers G.L., Shirley J.L., Zolotukhin I., Kumar S.P., Sherman A., Perrin G.Q., Hoffman B.E., Srivastava A., Basner-Tschakarjan E., Wallet M.A., Terhorst C., Biswas M., Herzog R.W. Plasmacytoid and conventional dendritic cells cooperate in cross-priming AAV capsid-specific CD8⁺ T cells. *Blood*, 2017, Vol. 129, no. 24, pp. 3184-3195.
128. Romero V., Fert-Bober J., Nigrovic P.A., Darrah E., Haque U.J., Lee D.M., van Eyk J., Rosen A., Andrade F. Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.*, 2013, Vol. 5, 209ra150. doi: 10.1126/scitranslmed.3006869.
129. Rosen A., Casciola-Rosen L. Autoantigens as partners in initiation and propagation of autoimmune rheumatic diseases. *Annu. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 34, pp. 395-420.
130. Rossi D., Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000, Vol. 18, pp. 217-242.
131. Rot A., von Andrian U.H. Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic Chemokinese Grammar for Immune Cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 891-928.
132. Salomonsson S., Larsson P., Tengner P., Mellquist E., Hjelmstrom P., Wahren-Herlenius M. Expression of the B Cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjögren's syndrome. *Scand. J. Immunol.*, 2002, Vol. 55, pp. 336-342.
133. Sarelius I.Y., Glading A.J. Control of vascular permeability by adhesion molecules. *Tissue Barriers*, 2015, Vol. 3, no. 1-2, e985954. doi: 10.4161/21688370.2014.985954.
134. Sato N., Beitz J.G., Kato J., Yamamoto M., Clark J.W., Calabresi P., Frackelton A.R. Jr. Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis *in vitro*. *Am. J. Pathol.*, 1993, Vol. 142, no. 4, pp. 1119-1130.
135. Scally S.W., Petersen J., Law S.C., Dudek N.L., Nel H.J., Loh K.L., Wijeyewickrema L.C., Eckle S.B.G., van Heemst J., Pike R.N., McCluskey J., Toes R.E., La Gruta N.L., Purcell A.W., Reid H.H., Thomas R., Rossjohn J. A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, no. 12, pp. 2569-2582.
136. Scheel T., Gursche A., Zacher J., Haupl T., Berek C. V-region gene analysis of locally defined synovial B and plasma cells reveals selected B cell expansion and accumulation of plasma cell clones in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2011, Vol. 63, no. 1, pp. 63-72.
137. Schellekens G.A., de Jong B.A., van den Hoogen F.H., van de Putte L.B., van Venrooij W.J. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.*, 1998, Vol. 101, no. 1, pp. 273-281.
138. Schonbeck U., Brandt E., Petersen F., Flad H.D., Loppnow H., IL-8 specifically binds to endothelial but not to smooth muscle cells. *J. Immunol.*, 1995, Vol. 154, no. 5, pp. 2375-2383.
139. Segura E., Amigorena S. Cross-presentation by human dendritic cell subsets. *Immunol. Lett.*, 2014, Vol. 158, no. 1-2, pp. 73-78.
140. Sharma D., Kanneganti T.D. The cell biology of inflammasomes: mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J. Cell Biol.*, 2016, Vol. 213, no. 6, pp. 617-629.

141. Shikama Y., Kobayashi K., Kasahara K., Kara S. Granuloma formation by artificial microparticles *in vitro*. Macrophages and monokines play a critical role in granuloma formation. *Am. J. Pathol.*, 1989, Vol. 134, no. 6, pp. 1189-1199.
142. Silver J., Goyert S.M. Epitopes are the functional units of Ia molecules and form the molecular basis for disease susceptibility, human class II histocompatibility antigens. In: Ferrone S., Solheim B.G., Moller E., editors. HLA class II antigens: a comprehensive review of structure and function. Berlin, Springer. 1985, pp. 32-48.
143. Skotnicki J.S., Zask A., Nelson F.C., Albright J.D., Levin J.I. Design and synthetic considerations of matrix metalloproteinase inhibitors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1999, 30: 878, pp. 61-72.
144. Sneller M.C. Granuloma formation, implications for the pathogenesis of vasculitis. *Cleve. Clin. J. Med.*, 2002, Vol. 69, Suppl. 2, pp. SII40-SII43.
145. Sottile J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, Vol. 1654, pp. 13-22.
146. Spolski R., Leonard W.J. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Ann. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 26, pp. 57-79.
147. Steed A.L., Stappenbeck T.S. Role of viruses and bacteria-virus interactions in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, Vol. 31, pp. 102-107.
148. Stone R.C., Feng D., Deng J., Singh S., Yang L., Fitzgerald-Bocarsly P., Eloranta. M., Ronnblom L., Barnes B.J. Interferon regulatory factor 5 activation in monocytes of systemic lupus erythematosus patients is triggered by circulating autoantigens independent of type I interferons. *Arthritis Rheum.*, 2012, Vol. 64, no. 3, pp. 788-798.
149. Stott D.I., Hiepe F., Hummel M., Steinhäuser G., Berek C. Antigen-driven clonal proliferation of B cells within the target tissue of an autoimmune disease. The salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.*, 1998, Vol. 102, pp. 938-946.
150. Strieter R.M., Polverini P.J., Kunkel S.L., Arenberg D.A., Burdick M.D., Kasper J., Dzuiba J., van Damme J., Walz A., Marriott D., Chan S.-Y., Rocznik S., Shanafelt A.B. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 1995, Vol. 270, no. 45, pp. 27348-27357.
151. Suzuki F., Kubota T., Miyazaki Y., Ishikawa K., Ebisawa M., Hirohata S., Ogura T., Mizusawa H., Imai T., Miyasaka N., Nanki T. Serum level of soluble CX3CL1/ fractalkine is elevated in patients with polymyositis and dermatomyositis, which is correlated with disease activity. *Arthritis Res. Ther.*, 2012, Vol. 14, no. 2, R48. doi: 10.1186/ar3761.
152. Swiecki M., Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no. 8, pp. 471-485.
153. Szekanecz Z., Halloran M.M., Haskell C.J. Mediators of angiogenesis: the role of cellular adhesion molecules. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 1999, Vol. 58, 73.
154. Szekanecz Z., Koch A.E. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2007, Vol. 19, no. 3, pp. 289-295.
155. Szekanecz Z., Koch A.E., Angiogenesis in rheumatoid arthritis. In: Rubanyi G.M., ed. Angiogenesis in health and disease. Marcel Dekker, New York, Basel, 2000, pp 429-450.
156. Szekanecz Z., Koch A.E. Chemokines and angiogenesis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2001, Vol. 13, no. 3, pp. 202-208.
157. Szekanecz Z., Szegedi G., Koch A.E. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J. Invest. Med.*, 1998, Vol. 46, no. 2, pp. 27-41.
158. Taniguchi N., Kawahara K., Yone K., Hashiguchi T., Yamakuchi M., Goto M., Inoue K., Yamada S., Ijiri K., Matsunaga S., Nakajima T., Komiya S., Maruyama I. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum.*, 2003, Vol. 48, no. 4, pp. 971-981.
159. Tengnér P., Halse A.-K., Haga H.-J., Jonsson R., Wahren-Herlenius M. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB auto-antibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, 1998, Vol. 41, no. 12, pp. 2238-2248.
160. Thurlings R.M., Wijbrandts C.A., Mebius R.E., Cantaert T., Dinant H.J., Teneke C.T., der Pouw-Kraan M., Verweij C.L., Baeten D., Tak P.P. Synovial Lymphoid Neogenesis Does Not Define a Specific Clinical Rheumatoid Arthritis Phenotype. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, no. 6, pp. 1582-1589.
161. Turunen S., Huhtakangas J., Nousiainen T., Valkealahti M., Melkko J., Risteli J., Lehenkari P. Rheumatoid arthritis antigens homocitrulline and citrulline are generated by local myeloperoxidase and peptidyl arginine deiminases 2, 3 and 4 in rheumatoid nodule and synovial tissue. *Arthritis Res. Ther.*, 2016, Vol. 18, 239. doi 10.1186/s13075-016-1140-9.
162. Ulfgrén A.K., Grundtman C., Borg K., Alexanderson H., Andersson U., Harris H.E. Lundberg I.E. Down-regulation of the aberrant expression of the inflammation mediator high mobility group box chromosomal protein 1 in muscle tissue of patients with polymyositis and dermatomyositis treated with corticosteroids. *Arthritis Rheum.*, 2004, Vol. 50, no. 5, pp. 1586-1594.

163. van der Aa E., van Montfoort N., Woltman A.M. BDCA3⁺CLEC9A⁺ human dendritic cell function and development. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2015, Vol. 41, pp. 39-48.
164. van der Woude D., Lie B.A., Lundstrom E., Balsa A., Feitsma A.L., Houwing-Duistermaat J.J., Verduijn W., Nordang G.B.N., Alfredsson L., Klareskog L., Pascual-Salcedo D., Gonzalez-Gay M.A., Lopez-Nevot M.A., Valero F., Roep B.O., Huizinga T.W.J., Kvien T.K., Martín J., Padyukov L., de Vries R.R.P., Toes R.E. Protection against anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1*1301: a meta-analysis of HLA-DRB1 associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in four European populations. *Arthritis Rheum.*, 2010, Vol. 62, no. 5, pp. 1236-1245.
165. Veale D.J., Fearon U. Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis: potential for therapeutic targeting. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2006, Vol. 20, no. 5, pp. 941-947.
166. Vogel D.Y., Glim J.E., Stavenuiter A.W., Breur M., Heijnen P., Amor S., Dijkstra C.D., Beelen R.H. Human macrophage polarization *in vitro*: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, 2014, Vol. 219, no. 9, pp. 695-703.
167. Voll R.E., Urbanaviciute V., Herrmann M., Kalden J.R. High mobility group box 1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2008, no. 10, pp. 26-28.
168. Williams G.T., Williams W.J. Granulomatous inflammation – a review. *J. Clin. Pathol.*, 1983, Vol. 3, no. 7, pp. 723-733.
169. Wu L., Fan J., Matsumoto S., Watanabe T. Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, Vol. 269, no. 3, pp. 808-815.
170. Wynn T.A., Vannella K.M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 3, 450-462. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.
171. Yamanaka H. TNF as a target of inflammation in rheumatoid arthritis. *Endocr. Metab. Immune*, 2015, Vol. 15, pp. 129-134.
172. Yang B.G., Tanaka T., Jang M.H., Bai Z., Hayasaka H., Miyasaka M. Binding of lymphoid chemokines to collagen IV that accumulates in the basal lamina of high endothelial venules: its implications in lymphocyte trafficking. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 7, pp. 4376-4382.
173. Young C.L., Adamson T.C., Vaughan J.H., Fox R.I. Immunohistologic characterization of synovial membrane lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1984, Vol. 27, no. 1, pp. 32-39.
174. Zhu H., Fang X., Zhang D., Wu W., Shao M., Wang L., Gu L. Membrane-bound heat shock proteins facilitate the uptake of dying cells and cross-presentation of cellular antigen. *Apoptosis*, 2016, Vol. 21, no. 1, pp. 96-109.

Автор:

Саидов М.З. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет», г. Махачкала, Республика Дагестан, Россия

Author:

Saidov M.Z., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology, Dagestan State Medical University, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russian Federation

Поступила 16.07.2021

Принята к печати 29.09.2021

Received 16.07.2021

Accepted 29.09.2021

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ И ТРИПТАЗА. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

Мачарадзе Д.Ш.

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Резюме. В настоящем обзоре рассматривается роль тучных клеток (ТК) и уровня триптазы при различных патологических состояниях у детей и взрослых. Приведены основные причины гипертриптаземии, а также перечень наиболее важных стимулов, которые могут вызвать активацию ТК. Основное внимание в своей клинической практике аллергологи должны уделять больным с анафилаксией и с подозрением на синдромы активации ТК. Кроме того, гипертриптаземия (> 20 нг/мл) считается дополнительным диагностическим критерием системного мастоцитоза согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения. Как правило, уровень триптазы остается постоянно повышенным у большинства больных с системным мастоцитозом, тогда как при острых IgE-опосредованных реакциях гиперчувствительности она изменяется. В случаях анафилаксии больному необходимо провести определение концентрации триптазы в первые часы от начала острой аллергической реакции и затем еще через 24–48 час. Даны рекомендации по определению уровня триптазы в сыворотке крови больных (базальная триптаза и пиковая триптаза) и алгоритмы применения этих показателей при различных заболеваниях. В статье дана также оценка пороговых значений триптазы в диагностике анафилаксии, синдромов активации ТК и нового заболевания — альфа-триптаземии. В диагностике наследственного заболевания альфа-триптаземии, а также синдромов активации ТК (первичных и вторичных) следует учитывать клинические проявления у больного и уровень триптазы в динамике. Накопленный опыт позволил экспертам рекомендовать учитывать прежде всего частоту тяжелых аллергических реакций (чаще всего в виде анафилаксий) у больных с подозрением на синдромы активации ТК. Синдром активации ТК характеризуется чрезмерным высвобождением содержимого гранул ТК без признаков клональной пролиферации, что во многих случаях может быть следствием удвоения аллельного гена, особенно гена α -триптазы *TPSAB1*. Для больных с наследственной альфа-триптаземией наиболее характерны проявления по типу вегето-сосудистой дистонии (орто-статистическая тахикардия), гипермобильность суставов и т.п. Таким образом, определению уровня триптазы (особенно в динамике) следует уделить больше внимания в практике клиницистов. Трудности в интерпретации результатов возникают в случаях, когда ее концентрация остается в пределах нормы (до 11,4 нг/мл), а клинически у пациента имеет место мастоцитоз или синдромы активации ТК. При наличии у пациента в анамнезе анафилаксии, особенно после укуса перепончатокрылых насекомых, следует исключить синдромы активации ТК.

Ключевые слова: тучные клетки, системный мастоцитоз, синдром активации тучных клеток, α -триптаземия, триптаза

Адрес для переписки:

Мачарадзе Дали Шотаевна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.
Тел.: 8 (495) 787-38-03 (доб. 2001).
E-mail: dalim_a@mail.ru

Address for correspondence:

Macharadze Dali Sh.
Peoples' Friendship University of Russia
117198, Russian Federation, Moscow,
Miklukho-Maclay str., 6.
Phone: 7 (495) 787-38-03 (acc. 2001).
E-mail: dalim_a@mail.ru

Образец цитирования:

Д.Ш. Мачарадзе «Тучные клетки и триптаза. Современные представления» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1271-1284.
doi: 10.15789/1563-0625-MCA-2193
© Мачарадзе Д.Ш., 2021

For citation:

D.Sh. Macharadze "Mast cells and tryptase. Modern aspects",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1271-1284.
doi: 10.15789/1563-0625-MCA-2193
DOI: 10.15789/1563-0625-MCA-2193

MAST CELLS AND TRYPTASE. MODERN ASPECTS

Macharadze D.Sh.

Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. The present review considers the role of mast cells (MC) and tryptase levels in various pathological conditions in children and adults. The main causes of hypertryptasemia are presented, as well as a list of the most important stimuli that can cause activation of MC. Clinical allergologists should focus their clinical practice on the patients with anaphylaxis and suspected MC activation syndromes. Moreover, hypertryptasemia (> 20 ng/ml) is considered an additional diagnostic criterion for systemic mastocytosis, according to the WHO recommendations. As a rule, the level of tryptase is constantly elevated in most patients with systemic mastocytosis, whereas it is undergo changes in acute IgE-mediated hypersensitivity reactions. In cases of anaphylaxis, tryptase concentration should be determined in the patients during the first hours following onset of acute allergic reaction, and 24-48 hours later. Recommendations are given for determining tryptase levels in blood serum of the patients (basal and peak values), and algorithms are provided for usage of these indexes in various diseases. The article also provides the assessed threshold values of tryptase when diagnosing anaphylaxis, MC activation syndromes, and a novel disorder — alpha-tryptasemia. In the diagnosis of hereditary alpha-tryptasemia, as well as MC activation syndromes (primary and secondary), clinical manifestations in the patient and time dynamics of tryptase levels should be taken into account. The accumulated experience allowed to consider, first of all, frequency of severe allergic reactions (most often as anaphylaxis) in the patients with suspected MC activation syndromes. The syndrome of MC activation is characterized by excessive release of their granule contents without signs of clonal proliferation, which in many cases may be due to gene allele duplication, especially, *TPSAB1* α -tryptase gene. For patients with hereditary alpha-tryptasemia, the most characteristic manifestations are represented by vegetative-vascular dystonia (orthostatic tachycardia), joint hypermobility, etc. Hence, determination of tryptase level (especially in time course) should be given more attention in the practice of clinicians. Difficulties with interpretation of the results arise in cases when tryptase concentration remains within normal range (up to 11.4 ng/ml), and the patient has clinically evident mastocytosis, or MC activation syndromes. If the patient has a history of anaphylaxis, especially after bites of hymenoptera insects, the TC activation syndromes should be excluded.

Keywords: mast cells, systemic mastocytosis, mast cell activation syndrome, α -tryptasemia, tryptase

Сокращения: ТК — тучные клетки, СМ — системный мастоцитоз.

Тучные клетки (ТК) были открыты Эрлихом П. в 1879 году. После этого еще долгое время их считали основными клетками-эффекторами анафилактики и других IgE-опосредованных аллергических заболеваний [4, 11].

Однако последнее десятилетие во многих лабораториях мира ученые проводят углубленные исследования, направленные на уточнение роли и значимости ТК в норме и при различных заболеваниях (табл. 1) [10]. Так, в 2019 г. появилась публикация группы немецких ученых, которые в течение 6 лет в 18 лабораториях страны изучали роль ТК по программе «Тучные клетки как стимуляторы здоровья и модуляторы заболеваний» [10]. Еще одна Европейская сеть по исследованию ТК и базофилов (EMBRN) совместно с Европейской сетью по мастоцитозу проводит детальное исследование этих универсальных клеток по программе «Тучные клетки и базофилы — мишени для инновационных методов лечения».

Тучные клетки — долгоживущие малоподвижные иммунные клетки. Они отличаются от общих миелоидных предшественников в костном мозге [15]. После того как незрелые предшественники ТК покидают костный мозг, с помощью специфических рецепторов интегрин и хемокинов они попадают в эпителиальные ткани кожи, дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. Кроме того, ТК оседают в периваскулярном пространстве и соединительной ткани, окружающих нервы, а затем окончательно дифференцируются в непролиферирующие зрелые клетки, содержащие секреторные гранулы. ТК созревают либо в костном мозге, либо после рекрутирования — в определенных тканях. Активация ТК в основном происходит дифференцированно, сопровождаясь высвобождением из своих секреторных гранул различных медиаторов, включая *de novo* синтезируемых, в зависимости от связывания с рецепторами IgE ($Fc\epsilon RI$ и $Fc\gamma RI/II$ типа) или стимуляции G-связанных и Toll-подобных рецепторов [15]. В результате чрезмерной пролиферации

ТАБЛИЦА 1. РАЗЛИЧНЫЕ РОЛИ ТК [10]

TABLE 1. DIVERSE ROLES OF MCs [10]

Роль Role	Механизмы Mechanism	Регуляция Setting
Взаимодействие с гранулоцитами Interaction with granulocytes	С нейтрофилами: секреция $TNF\alpha$ и GM-CSF (ТК) → рекрутинг и активация ТК. With neutrophils $TNF\alpha$ and GM-CSF secretion (MCs) → Recruitment and activation С эозинофилами: секреция IL-5, GM-CSF, IL-3 (ТК) → рекрутинг, активации PAF, SCF, NGF, EMBP, ECP и секреция пероксидазы эозинофилов → активация ТК With eosinophils IL-5, GM-CSF, IL-3 secretion (MCs) → Prolonged survival, activation PAF, SCF, NGF, EMBP, ECP, and eosinophil peroxidase secretion (Eo) → MC activation Прямое взаимодействие ТК с CD48-2B4 → высвобождение медиаторов ТК Direct MC CD48-2B4 interaction → MC mediator release	Сразу после воздействия патогена Immediately after pathogen encounter
Активация и рекрутинг эффекторных клеток Activation and recruitment of effector cells	Секреция CCL5 → CD8 Т-клетки, HLA и костимулирующие молекулы (MCs) → презентация антигена, (ре)-активация CD4 Т-клеток, секреция $TNF\alpha$ и экзосом (ТК) → активация Т-клеток CCL5 secretion → CD8 T-cell recruitment MHC class II and costimulatory molecules (MCs) → Antigen presentation, CD4 T cell (re)-activation OX40 triggering, $TNF\alpha$ and exosome secretion (MCs) → T-cell activation Секреция гистамина, рекрутинг дендритных клеток в лимфоузлы (ТК) → стимуляция адаптивного иммунного ответа Histamine secretion, DC recruitment to draining lymph nodes (MCs) → Stimulation of adaptive immune responses	Инфекция, вакцинация, опухоль, беременность, воспалительные заболевания дыхательных путей Infection, vaccination, tumor, pregnancy, inflammatory airway disease
Прямые антимикробные эффекты Direct antimicrobial effects	Секреция кателицидинов, TLR2-зависимая дегрануляция, фагоцитоз → инактивация патогенов Cathelicidin secretion, TLR2-dependent degranulation, phagocytosis → Pathogen inactivation	Бактериальная, вирусная и паразитарная инфекции в легких, коже и кишечнике Bacterial, viral, and parasitic infections of the lung, skin, and intestinal tract
Разрушение токсинов и яда насекомых Degradation of toxins and venoms	Дегрануляция → протеолиз Degranulation → Proteolytic degradation	Инттоксикация ядом насекомых, змей или другими ядами Intoxication with insect, snake, or other venoms
Ремоделирование физиологической ткани Physiologic tissue remodeling	Взаимодействие с трофобластами и НК матки → ремоделирование спиральной артерии. Секреция MCP4 и MCP6 → влияние на рубцовые компоненты Interaction with trophoblasts and uterine NK cells → Spiral artery remodeling. MCP4 and MCP6 secretion → Cleavage of scar components	Беременность, травма ЦНС Pregnancy, CNS trauma

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Роль Role	Механизмы Mechanism	Регуляция Setting
Ремоделирование патологической ткани Pathogenic tissue remodeling	Секреция протеаз ТК, продолжение секреции провоспалительных цитокинов → фиброз, гипертрофия гладкой мускулатуры, возможно, также метаплазия бокаловидных клеток MC protease secretion, sustained proinflammatory cytokine release → Fibrosis, smooth muscle hypertrophy, possibly also goblet cell metaplasia Секреция IL-8 → эпителиально-мезенхимальный процесс IL-8 secretion → Epithelial-to-mesenchymal transition	Хроническое аллергическое воспаление, опухоль Chronic allergic inflammation, tumor
Индукция ангиогенеза Angiogenesis induction	Секреция про-ангиогенных факторов типа VEGF → рост опухоли Secretion of pro-angiogenic factors like VEGF → tumor growth Возможно, напротив, с ТК связаны меньшая васкуляризация и рост опухоли But also contracting findings, linking MC to less tumor vascularization and growth	Опухоль Tumor
Усиление воспаления Amplification of inflammation	Массивное высвобождение гистамина, лейкотриенов и TNFα в результате полной или частичной дегрануляции → воспаление, анафилаксия, повышение сосудистой проницаемости Massive release of histamine, leukotrienes and TNF α by means of full or piecemeal degranulation → Inflammation, ranging from local to systemic anaphylaxis, increased vascular permeability. Продукция эйкозаноидов (PGD₂ и LTC₄) после дегрануляции → повышение сосудистой проницаемости, рекруитмент лейкоцитов, продукция слизи Eicosanoid (PGD ₂ and LTC ₄) production after degranulation → Increased vascular permeability, leukocyte recruitment, mucus production. Продукция цитокинов IL-1-семейства и процессинг → активация различных иммунных и эндотелиальных клеток, секреция IL-4 → Th2 тип (Т-клетки), секреция IL-12, Th1/Th17 прайминг (при инфекции – дендритными клетками), переключение на секрецию IgE (В-клетками), продукция IL-13 IL-1 family cytokine production and processing → Activation of various immune cells and endothelial cells IL-4 secretion → Th2 skewing (T cells), IL-12 secretion, Th1/Th17 priming (DCs in early infection), switch to IgE secretion (B cells), IL-13 production (MCs)	Аллергия и Th2-тип воспаления, инфекция, интоксикация Allergy and Th2 inflammation, infection, intoxication
Нейрогенное воспаление Neurogenic inflammation	Стимуляция ТК С-фибрил вещества Р → дегрануляция ТК Stimulation of MCs by C-fiber substance P → Degranulation	Астма Asthma

Примечание. ЦНС – центральная нервная система; DC (dendritic cell) – дендритная клетка; ECP (eosinophil cationic protein) – эозинофильный катионный белок; EMBP (eosinophil major basic protein) – основной эозинофильный белок; Lt C4 – лейкотриен C4; MCP (monocyte chemoattractant protein) – хемоаттрактантный белок моноцитов; NGF (nerve growth factor) – фактор роста нервов; NK (natural killer) – клетки-киллеры; PAF (platelet-activating factor) – фактор активации тромбоцитов; PGD₂ (prostaglandin D₂) – простагландин D₂; SCF (stem cell factor) – фактор стволовых клеток; TLR (Toll-like receptor) – Toll-подобный рецептор.

Note. CNS, Central nervous system; DC, dendritic cell; ECP, eosinophil cationic protein; EMBP, eosinophil major basic protein; LTC₄, leukotriene C4; MCP, monocyte chemoattractant protein; NGF, nerve growth factor; NK, natural killer; PAF, platelet-activating factor; PGD₂, prostaglandin D₂; SCF, stem cell factor; TLR, Toll-like receptor.

ТК и эпизодического высвобождения медиаторов у больных появляется широкий спектр клинических проявлений. В случаях мутации в локусе гена *c-kit* происходит клональная пролиферация ТК (мастоцитоз) или опухолевая трансформация при мутации в кодоне 816 *c-kit* [15]. Мутация протоонкогена *c-kit* чаще всего встречается у взрослых, тогда как у детей обычно генные мутации связаны со спонтанными случаями цитокин-обусловленной гиперплазии ТК, мутациями гена *c-kit*, отличными от кодона 816, или с другими до сих пор неизвестными мутациями.

ТК расположены в местах, которые тесно взаимодействуют с внешней средой: в коже, легких и кишечнике. Их постоянно находят также в желудочно-кишечном тракте, где они участвуют в регуляции функции эпителия и эндотелия слизистой оболочки; во взаимодействии с нервной системой кишечника и в защитных реакциях против бактериальных, вирусных и паразитарных агентов [15]. Так, при обнаружении гельминтов, расположенные рядом с нервами ТК вызывают их стимуляцию, что приводит к перистальтике кишечника и регуляции проницаемости эпителия. В свою очередь, высвобождаемые из гранул ТК цитотоксические факторы вызывают рекрутирование других провоспалительных клеток и образование гранулемы вокруг паразита.

Интересно отметить, что в ткани пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника (болезнь Крона, язвенный колит), синдромом раздраженного кишечника, целиакией и пищевой аллергией обнаруживают гиперплазию и активацию ТК, где происходит их дегрануляция.

Другой важный компонент, стимулирующий дегрануляцию ТК, — это IgE. Связывание аллергена (антигена) с высокоаффинным FcR I рецептором IgE, экспрессируемых ТК, запускает механизм IgE-опосредованной реакции с высвобождением множества медиаторов (цитокины/хемокины, биогенные амины, TNF α , гистамин и т.п.) [4, 10, 11, 15].

Подобный механизм дегрануляции ТК и высвобождение из них липидных медиаторов, предположительно, имеет место также в патогенезе бронхиальной астмы. Установлено, что ТК инфильтрируют гладкую мускулатуру бронхов и альвеолярную паренхиму у детей и взрослых, особенно, имеющих частые обострения бронхиальной астмы, в том числе на фоне респираторно-синцитиальной вирусной инфекции [4, 9, 10].

Роль IgE-индуцированной дегрануляции ТК при бронхиальной астме подтверждается эффек-

тивностью терапии моноклональным анти-IgE омализумабом, который связывается со свободным IgE и снижает экспрессию Fc ϵ RI на ТК и базофилах. Клинически это проявляется в снижении обострений и употребления лекарств у больных с atopической бронхиальной астмой [12].

Терапевтическая эффективность при использовании других биологических препаратов (меполизумаб, иматимаб) при рефрактерной бронхиальной астме также демонстрирует возможный механизм их действия, направленный, в том числе, на торможение активности ТК.

IgE-зависимая дегрануляция ТК, по всей вероятности, имеет место и при хронической крапивнице, что подтверждает хороший клинический ответ на омализумаб у больных, имеющих существенно более высокий уровень общего IgE в сыворотке (полные респондеры), чем нереспондеры [14]. У 20% пациентов с хронической крапивницей наблюдается физическая крапивница на такие триггеры, как давление, изменения температуры или солнечное облучение. Очень редко среди них встречается аутосомно-доминантная форма хронической крапивницы, вызванная мутацией в дерматансульфат-связывающем рецепторе на ТК, что сопровождается возникновением уртикарий после вибрации и давления на кожу вследствие дегрануляции ТК [5].

Напрямую дегрануляцию ТК могут вызвать также другие воспалительные медиаторы (нейропептиды, IgG, цитокины, хемокины, компоненты комплемента и т.п.), в дальнейшем стимулирующие их дифференцировку, пролиферацию и/или миграцию.

ТК находятся преимущественно ниже эпителиального слоя, они тесно связаны с кровеносными сосудами, дендритными клетками, близко расположены к лимфатическим сосудам и периферическим нервам.

Пол Эрлих был первым, кто обратил внимание на то, что ТК собираются вокруг кровеносных сосудов в опухолевой ткани. Он предположил, что эти клетки помогают реконструировать сосудистую сеть, способствуя доставке кислорода и питательных веществ (отсюда введенный им термин — *mastzellen* (питающие клетки)).

Связь между ТК и кровеносными сосудами способствует ускорению притока эффекторных клеток из кровотока в соседние ткани. Этот процесс облегчается за счет быстрой продукции ТК таких цитокиновых медиаторов, как TNF α и IL-1, активирующим эндотелий, липидные медиаторы и вызывающие вазодилатацию, а также ряда хемокинов, которые способствуют селек-

тивному привлечению (рекрутированию) иммунных эффекторных клеток. Продуцируемый ТК $\text{TNF}\alpha$ является фактором, влияющим на быстрое привлечение нейтрофилов в ткань. В свою очередь, ТК и эозинофилы взаимоусиливают активацию за счет растворимых медиаторов и тесного контакта друг с другом («эффекторная единица аллергии») [8, 10]. Также прямой контакт ТК с Т-клетками способствует быстрому высвобождению таких медиаторов, как $\text{TNF}\alpha$, IL-4, IL-6 или IL-8. Экспериментально установлено, что ТК мышей продуцируют антимикробные пептиды — кателицидины через Toll-подобные рецепторы и взаимодействие с врожденными иммунными клетками [10].

Зрелые ТК человека делят на две субпопуляции: 1) TK_{TC} , которые экспрессируют сериновые протеазы — триптазу, химазу, карбоксипептидазу и катепсин, и преобладают в соединительной ткани и коже; 2) TK_{T} , экспрессирующие только триптазу, — их больше в здоровой паренхиме легких и слизистой оболочке кишечника [15].

Механизмы действия каждой из этих подгрупп ТК отличаются. Так, активация TK_{T} путем связывания с FcRI рецептором IgE приводит к классической IgE-опосредованной реакции гиперчувствительности. Напротив, TK_{TC} экспрессируют связанный с G-белком рецептор MRGPRX2, который при активации менее интенсивно высвобождает гранулы, участвующие в развитии анафилактических реакций; MRGPRX2 может активироваться также эндогенными пептидами (вещество P, анафилатоксины C3a и C5a) и лекарственными средствами (ванкомицин, морфин, сульфаметоксазол) [15]. Активация MRGPRX2 имеет место и при хронической спонтанной крапивнице. Кроме того, высвобождаемая из TK_{TC} химаза участвует в превращении ангиотензин I в ангиотензин II, тем самым способствуя ремоделированию сосудов при бронхиальной астме, атеросклерозе и аневризме аорты [15].

Установлено, что ТК легких и подслизистой оболочки кишечника содержат более высокую концентрацию триптазы, чем ТК кожи и слизистой оболочки кишечника [13]. Причем воспалительные цитокины (в том числе IL-4), могут изменять баланс ТК в легких в сторону преобладания TK_{TC} у больных бронхиальной астмой [3]. Эти наблюдения предполагают степень пластичности и взаимопревращения между этими двумя подтипами ТК в зависимости от микросреды [15].

Важной особенностью ТК является экспрессия гена *c-kit* — рецептора протеинтирозинкиназы, мутация которого может вызвать их кло-

нальную пролиферацию и является ключевым фактором в патогенезе мастоцитоза [7].

В раннем детстве соматически активирующие мутации в гене *kit* предшественников ТК могут быть причиной доброкачественного заболевания — мастоцитоза кожи. Однако в более позднем возрасте мутации гена *c-kit* проявляются в накоплении предшественников ТК в костном мозге, а не в коже, что связано с развитием системного заболевания и его более агрессивным течением [15].

ТК играют ведущую роль в патофизиологии так называемого первичного синдрома активации ТК (mast cell activation syndromes), который включает системный мастоцитоз (СМ), клональное заболевание, связанное с мутацией гена *c-kit*; синдром активации клональных ТК, который ассоциирован с аналогичной мутацией *c-kit* и/или экспрессией CD25, но при отсутствии других критериев диагностики СМ; врожденную α -триптаземию, связанную с увеличением числа копий гена *TPSAB1*, кодирующего α -триптазу; и идиопатический синдром активации ТК, при котором не удается идентифицировать ни триггеров, ни мутаций (табл. 2) [15].

Первичные нарушения ТК

К первичным нарушениям ТК относят две группы заболеваний: СМ и синдром первичной активации ТК (табл. 2) [15].

Мастоцитоз считается редкой патологией (возможно, из-за гиподиагностики в том числе), которая может поражать детей и взрослых. У взрослых мастоцитоз почти всегда — системное заболевание, которое характеризуется хроническим течением, с многообразными симптомами со стороны кожи (зуд, шелушение, гиперемия), желудочно-кишечного тракта (колики, диарея, диспепсия), костей (остеопороз, боль), а также другими проявлениями (усталость, головная боль, проблемы с памятью) и высоким риском развития анафилаксии. У детей симптомы, как правило, ограничиваются кожей, и заболевание претерпевает своеобразное спонтанное разрешение до зрелого возраста.

СМ — клональное новообразование из ТК, вызываемое мутацией в ДНК ТК, кодирующей *c-kit*, рецептор протеинтирозинкиназы, активация которой может не только способствовать пролиферации и выживанию ТК, но и их дегрануляции.

Синдром первичной активации ТК связан с аналогичными мутациями *c-kit* и/или aberrантной экспрессией CD25, но для него не характерны критерии диагностики СМ на основе

ТАБЛИЦА 2. ПЕРВИЧНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ТК [4]

TABLE 2. PRIMARY MAST CELL DISORDERS [4]

Мастоцитоз Mastocytosis Клональная пролиферация ТК, редкие, спорадические, активирующие мутации генов Clonal MC proliferation, rare, sporadic, activating gene mutations		
Подтипы Subtypes	Системный (поражение костного мозга) – часто встречается у взрослых, редко у детей Systemic (bone marrow involvement) common in adults, rare in children	Кожный (обычно без вовлечения костного мозга) – чаще встречается у детей, чем у взрослых, в виде диффузного процесса (пигментная крапивница) или одиночной мастоцитомы Cutaneous (usually without bone marrow involvement) more common in children than adults diffuse, multicentric (urticaria pigmentosa), solitary (mastocytoma)
Гистология Histology	Мультифокальные, плотные инфильтраты ТК (≥ 15 тучных клеток в агрегатах) в костном мозге и/или других внекожных органах Multifocal, dense infiltrates of MC (≥15 mast cells in aggregates) in bone marrow and/or other extracutaneous organs ТК могут иметь атипичную морфологию, например, веретенообразную; экспрессия CD2/CD25 или при более агрессивной форме – недифференцированный фенотип MC may have atypical morphology, for example, spindle-shape, CD2/CD25 expression or in more aggressive forms an undifferentiated phenotype	
Клиническая форма Clinical course	Варьируется от индолентной до злокачественной (острый или хронический лейкоз) Ranges from indolent to malignant (acute or chronic leukemia)	Индолентный, начинается в младенчестве, обычно регрессирует до полового созревания Indolent, starts in infancy, usually regresses before puberty
Клинические признаки Clinical features	Флешинг, боль в животе, диарея, мышечные боли, переломы, неврологические и психиатрические симптомы, гипотензия / анафилаксия, со злокачественными новообразованиями: лихорадка, потеря веса, гепатоспленомегалия Flushing, abdominal pain, diarrhea, muscle aches and pains, fractures, neurological and psychiatric symptoms, hypotension/anaphylaxis with malignancy: fevers, weight loss, hepatosplenomegaly	Флешинг, крапивница, ангионевротический отек, кожные симптомы реже Flushing, urticaria, angioedema, non-cutaneous symptoms less common
Генетика Genetics	Спорадическая активирующая мутация <i>c-kit</i> D816V у 90%, могут быть дополнительные мутации в PDGFRA/B, TET2, H-PAH Sporadic D816V activating <i>c-kit</i> mutation in 90%, may have additional mutations in PDGFRA/B, TET2, N-RAS	Спорадическая активирующая мутация <i>c-kit</i> D816V в 20-40% случаев, другие активирующие мутации <i>c-kit</i> – в 60% Sporadic D816V activating <i>c-kit</i> mutation in 20%-40%, other activating <i>c-kit</i> mutations in 60%MC
Уровень триптазы в сыворотке крови Tryptase	> 20 нг/мл > 20 ng/mL	< 20 нг/мл < 20 ng/mL

Таблица 2 (продолжение)
Table 2 (continued)

Терапия Potential therapies	Антигистаминные препараты второго поколения, ранитидин, стабилизаторы ТК (кромогликат, кетотифен), кортикостероиды, иматиниб, только если нет мутации D816V, мидостаурин (ингибитор протеинкиназы), химиотерапия при лейкомии Second- or third-generation antihistamines, ranitidine, mast cell stabilizers (cromoglycate, ketotifen), corticosteroids, imatinib only if no D816V mutation, midostaurin (protein kinase inhibitor), chemotherapy for leukemia	Обычно достаточно антигистаминных препаратов второго поколения Second- or third-generation antihistamines usually suffice
Синдром активации тучных клеток Mast cell activation syndromes		
	Чрезмерная активность ТК без клональной пролиферации или явных вторичных триггеров; α-триптаземия (является распространенным аутосомно-доминантным состоянием, встречающимся в подгруппе пациентов) Excessive mast cell activity without clonal proliferation or obvious secondary triggers; α -tryptasemia is a common autosomal dominant condition occurring in a subset of patients	
Подтип Subtypes	α-триптаземия (до 5% от общей численности населения) α -tryptasemia (up to 5% of general population)	Идиопатический (нет доказательств мастоцитоза, α-триптаземии или вторичных причин) Idiopathic (no evidence of mastocytosis, α -tryptasemia, or secondary cause)
Гистология Histology	Может быть повышено количество ТК, особенно, в желудочно-кишечном тракте, но они не образуют агрегатов; может быть повышен уровень эозинофилов May have increased number of MC, particularly in GI tract, but do not form aggregates, may be associated with increased eosinophils	Нет агрегатов ТК No MC aggregates
Клиническое течение Clinical course	Переменное, может зависеть от степени репликации генов, других генетических или экологических кофакторов Variable, may depend on degree of gene replication, other genetic or environmental cofactors	Сходные с α-триптаземией Similar to α -tryptasemia
Клинические признаки Clinical features	Приливы крови, крапивница, ангионевротический отек, боль в животе, диарея, но есть боли и боли в слизистых и мышцах, головные боли, гипермобильные суставы, постортостатическая тахикардия, неврологические и психиатрические симптомы. Оценка родителей и братьев и сестер Flushing, urticaria, angioedema, abdominal pain, diarrhea, but have mucous and blood muscle aches and pains, headaches, hypermobile joints, POTS, neurological and psychiatric symptoms assess parents and siblings	Сходные с α-триптаземией Similar to α -tryptasemia
Генетика Genetics	Аллельная репликация гена <i>TPSAB1</i> обычно аутосомно-доминантная Allelic <i>TPSAB1</i> gene replication usually autosomal dominant	No defined genetic cause Не определена генетическая причина

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Базальная триптаза МС Basal MC tryptase	$\geq 8,0$ нг/мл ≥ 8.0 ng/mL	Нет единого мнения относительно концентраций триптазы МС, гистамина или простагландина No consensus regarding MC tryptase, histamine, or prostaglandin concentrations
Возможные методы лечения Potential therapies	Антигистаминные препараты второго или третьего поколения, ранитидин, стабилизаторы тучных клеток (кромогликат/кетотифен), диетические манипуляции, иматиниб обычно неэффективен Second- or third-generation antihistamines, ranitidine, mast cell stabilizers (cromoglycate/ketotifen), dietary manipulation, imatinib typically ineffective	Как при α -триптаземии As for α -tryptasemia

ТАБЛИЦА 3. КЛАССИФИКАЦИЯ МАСТОЦИТОЗА (ВОЗ, 2016) [16]

TABLE 3. CLASSIFICATION OF MASTOCYTOSIS (WHO, 2016) [16]

Кожный мастоцитоз: Cutaneous mastocytosis:
Пятнисто-папулезный кожный мастоцитоз = пигментная крапивница Maculopapular cutaneous mastocytosis = urticaria pigmentosa Диффузный кожный мастоцитоз Diffuse cutaneous mastocytosis Мастоцитомы кожи Mastocytoma of skin
Системный мастоцитоз (СМ): Systemic mastocytosis (SM):
Индолентный СМ Indolent SM Тлеющий СМ Smoldering SM СМ с ассоциированными гематологическим новообразованием SM with associated hematologic neoplasm Агрессивный СМ Aggressive SM Лейкемия тучных клеток Mast cell leukemia
Саркома тучных клеток Mast cell sarcoma

рекомендаций Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (табл. 3) [6].

СМ с активирующими мутациями *c-kit* в ТК костного мозга редко встречается у детей. Более 80% взрослых пациентов с СМ и около 30% случаев кожного мастоцитоза у детей имеют точечную мутацию, приводящую к замене аспарагиновой кислоты на валин в кодоне 816 (D816V). В остальных случаях наблюдаются различные мутации, затрагивающие внеклеточную, юкстамембранную или каталитическую области [7, 14].

Клиническое течение СМ варьирует от индолентного до злокачественных форм заболевания

(острый или хронический лейкоз ТК, саркома ТК) [6].

Диагноз «СМ» устанавливают на основании обнаружения в костном мозге и других тканях плотных инфильтратов из ТК, состоящих как минимум из 15 таких клеток. Согласно рекомендации ВОЗ для диагностики СМ необходимо наличие у больного среди одного главного и четырех второстепенных критериев — одного главного и одного дополнительного или трех дополнительных критериев (табл. 3-5) [6, 16].

Обычно исследование костного мозга не рекомендуется проводить пациентам, у кото-

ТАБЛИЦА 4. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ СМ

TABLE 4. DIAGNOSTIC CRITERIA FOR SM

Главный критерий Major criterion	Множественные конгломераты из ТК (≥ 15) в костном мозге и/или в других органах Multifocal, dense infiltrates of MCs (≥ 15 mast cells in aggregates) detected in sections of bone marrow and/or other extracutaneous organs
Дополнительные критерии Minor criteria	> 25% ТК атипичны в костном мозге > 25% abnormal MCs presence in the bone marrow Мутация <i>kit D816V</i> в крови или костном мозге или в других органах Detection of an activating point mutation at codon 816 of KIT in bone marrow, blood or other extracutaneous organ Уровень триптазы более 20 нг/мл в периферической крови Serum total tryptase level > 20 ng/mL
В-признаки (инфильтрация ТК или фиброз органа без нарушения функции органа) B signs (infiltration of MC or fibrosis of an organ without impairing organ function)	> 30% ТК в костном мозге и/или уровень триптазы в крови >200 нг/мл > 30% infiltration of cellularity by mast cells and/or serum total tryptase level > 200 ng/mL Экспрессия CD25 и/или CD2 ТК в костном мозге Express CD25 with/without CD2 in bone marrow Признаки дисплазии или миелопролиферации не ТК, однако недостаточные для верификации гематологического заболевания не ТК (показатели крови в пределах нормы) Signs of dysplasia or myeloproliferation, in non-mast cell lineage(s), but insufficient criteria for definitive diagnosis of an associated hematological neoplasm, with normal or only slightly abnormal blood counts Гепатомегалия без нарушения функции печени и/или спленомегалия без гиперспленизма, и/или лимфаденопатия Hepatomegaly without impairment of liver function, palpable splenomegaly without hypersplenism, and/or lymphadenopathy on palpation or imaging
С-признаки (инфильтрация ТК, приводящая к дисфункции органа) C-signs (infiltration of MC leading to organ dysfunction)	Цитопения (гемоглобин < 100 г/л, нейтрофилы < $1,0 \times 10^9$/л, тромбоциты < 100×10^9/л), без признаков неоплазии не ТК Bone marrow dysfunction caused by neoplastic mast cell infiltration, manifested by ≥ 1 cytopenia(s) (ANC < 1.0×10^9/L, Hgb < 10 g/dL, and/or platelet count < 100×10^9/L) Гепатомегалия с признаками нарушения функции печени, асцит и/или портальная гипертензия Hepatomegaly with impairment of liver function, ascites and/or portal hypertension Остеопения/остеолиз Osteopenia / osteolytic lesions Спленомегалия с гиперспленизмом Splenomegaly with hypersplenism Мальабсорбция, сопровождаемая потерей веса в связи с инфильтрацией желудочно-кишечного тракта ТК Malabsorption with weight loss due to gastrointestinal mast cell infiltrates

ТАБЛИЦА 5. КРИТЕРИИ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОРАЖЕНИЯ КОЖИ ПРИ МАСТОЦИТОЗЕ

TABLE 5. CRITERIA FOR DETECTING SKIN LESIONS IN MASTOCYTOSIS

Основной критерий Major criterion	Типичные проявления мастоцитоза и/или атипичные проявления в сочетании с положительным симптомом Дарье Typical manifestations of mastocytosis and/or atypical manifestations in combination with a positive Darrieus symptom
Малый критерий Minor criteria	Увеличение числа ТК в пораженных участках Increase in the number of MCs in the affected areas Активация/мутация c-kit в пораженных участках Activation/mutation of c-kit in affected areas

рых уровень триптазы в сыворотке крови менее 20 нг/мл (или 11,5 нг/мл у пациентов с тяжелой анафилаксией), хотя ее нормальное содержание не исключает диагноз СМ. Однако все взрослые пациенты, имеющие в анамнезе эпизод анафилаксии на укус перепончатокрылых насекомых, должны быть обследованы на СМ, даже если у них нет кожных проявлений и базальный уровень триптазы нормальный [10, 16]. Такой риск развития анафилаксии у детей очень низкий. По различным данным, частота встречаемости первичного синдрома клональных ТК при аллергии на яд насекомых варьирует от 7 до 94%, но выше у пациентов, имеющих в анамнезе гипотензию и обморок после укуса перепончатокрылых насекомых [15].

В диагностические критерии СМ включены также так называемые В-признаки (инфильтрация ТК или фиброз органа без нарушения функции органа) или С-признаки (инфильтрация ТК, приводящая к дисфункции органа) заболевания [6].

Агрессивное течение заболевания (рак), как правило, у больных сопровождается лихорадкой, потерей веса, цитопенией, болью в костях и гепатоспленомегалией (С-критерии). В таких случаях уровень триптазы в сыворотке крови может достигать > 200 нг/мл.

Мастоцитоз у детей обычно начинается у детей первых лет жизни, чаще поражается только кожа (кожный мастоцитоз), в биопсии костного мозга отсутствуют ТК и нет других диагностических критериев СМ. При этом сыпь полиморфная, разных размеров и формы.

Обычно в первые 3-4 года после начала заболевания у таких детей отмечаются зуд кожи, флешинг, могут быть даже буллезные высыпания.

В дальнейшем у всех таких детей и у 2/3 взрослых поражение кожи, традиционно называемое пигментной крапивницей (макуло-папулезный кожный мастоцитоз), проявляется в виде краснокоричневых пятен или слегка приподнятых папул различных размеров, а также бляшек и волдырей.

Важной клинической особенностью кожного мастоцитоза у детей является положительный признак Дарье, который лучше всего выявляют путем механического раздражения (например шпателем) пораженного очага кожи около 5 раз. В результате через несколько минут развивается реакция в виде отечной эритемы кожи, усиления зуда и даже появления пузырей.

Признак Дарье отличается от дермографизма тем, что не влияет на окружающую неповрежденную кожу и является специфическим диагностическим признаком именно мастоцитоза (табл. 5).

В редких случаях у таких больных укусы насекомых, физические факторы (например, изменения температуры во время купания или плавания) или прием лекарств (нестероидные противовоспалительные препараты, опиаты, миорелаксанты) могут провоцировать развитие гипотензии.

У детей заболевание, как правило, ограничивается кожей и симптомы часто бывают слабо выраженными. В то же время мастоцитоз у взрослых почти всегда является системным заболеванием, сопровождается повышенным риском развития анафилаксии, остеопороза и других осложнений. В таблице 6 приведены отличительные особенности течения мастоцитоза у детей и взрослых [6].

Синдром первичной активации ТК, включая α -триптаземию

Синдром активации ТК характеризуется чрезмерным высвобождением содержимого гранул ТК без признаков клональной пролиферации, что во многих случаях может быть следствием удвоения аллельного гена, особенно гена α -триптазы *TPSAB1* [16].

Синдром активации ТК описан относительно недавно. Его диагностируют у больных после исключения мастоцитоза и вторичных причин аллергии на основании клинических особенностей и повышения уровня триптазы в сыворотке крови (содержание гистамина и простагландинов также могут быть повышено) [15, 16]. В клинической практике синдром активации ТК всегда

ТАБЛИЦА 6. СРАВНЕНИЕ МАСТОЦИТОЗА У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ [6]

TABLE 6. COMPARISON OF PEDIATRIC AND ADULT MASTOCYTOSIS [6]

Категория болезни Typical disease category	Мастоцитоз у детей Pediatric mastocytosis	Мастоцитоз у взрослых Adult mastocytosis
	Мастоцитоз кожи Cutaneous mastocytosis	Системный мастоцитоз Systemic mastocytosis
Мутация <i>kit</i> D816V <i>kit</i> D816V mutation	20-30%	> 90%
Повреждение кожи Skin lesions	Всегда присутствует Always present	Присутствует примерно в 2/3 случаев Present in around 2/3
Типичный уровень триптазы (нг/мл) Typical tryptase level (ng/ml)	< 11,4 (нормальный) < 11.4 (normal)	> 20, но может быть нормальным > 20, but may be normal
Типичное течение болезни Typical course of the disease	Разрешение в 3/4 случаев в пубертантном возрасте Resolution in 3/4 around puberty	Хроническое течение Chronic
Симптомы Symptoms	Обычно ограничивается кожей и поддается лечению с помощью ингибиторов медиаторов ТК Typically limited to the skin and manageable by anti-MC mediator treatment	Очень неоднородные, могут быть тяжелыми и трудно поддающимся контролю Very heterogeneous, and may be severe and difficult to control
Внекожные проявления Extracutaneous manifestations	Редко, но могут встречаться гастроинтестинальные симптомы Rare, but GI-symptoms may be encountered	Часто, в том числе остеопороз Frequent, including osteoporosis
Риск анафилаксии Risk for anaphylaxis	Низкий (1-9%) Low (1-9%)	Высокий (35-50%) High (35-50%)
Прогрессирующее / агрессивное заболевание Advanced / aggressive disease	Чрезвычайно редко Exceedingly rare	У 5-10% пациентов 5-10% of patients

следует иметь в виду при развитии у больных анафилаксии с вовлечением двух органов и систем, особенно, после укуса перепончатокрылых насекомых [15].

Семейная триптаземия

Наследственная α -триптаземия — генетическое заболевание, которое возникает в результате увеличения числа копий *TPSAB1*, кодирующего α -триптазу, и характеризуется повышением базального уровня триптазы (> 8 нг/мл). У таких больных в анамнезе отмечаются эпизоды гастроинтестинальных и неврологических нарушений, изменения со стороны соединительной ткани, многие из них сообщают о симптомах, связанных с активацией ТК (таких как хроническая спонтанная крапивница и, реже, аллергическая астма).

Установлено, что 29% людей (до 45% среди белых европейцев) не экспрессируют гены α -триптазы, а 5% имеют аллельные дупликации гена *TPSAB1*, унаследованные по аутосомно-доминантному типу [15]. Трипликации и даже квинтпликации гена встречаются реже и в таких случаях у больных обнаруживают более тяжелое течение заболевания при высокой концентрации триптазы в сыворотке крови [15].

При репликации гена *TPSAB1* у детей и взрослых, напротив, сывороточный уровень триптазы составляет $\geq 8,0$ нг/мл, однако клинические признаки указывают на синдром активации ТК (флешинг, ангионевротический отек, боль в животе, диарея и пищевая непереносимость, гипермобильность суставов, системная реакция на яд

перепончатокрылых, эпизоды гипотензии и вегетативной дисфункции) [15].

У некоторых больных может встречаться аутосомно-доминантное течение α -триптаземии. Клинически это проявляется как вибрационная крапивница на фоне желудочно-кишечной, скелетно-мышечной, вегетативной дисфункций и атопическими заболеваниями. Вибрационную крапивницу (аутосомно-доминантное заболевание) связывают с усилением функциональной мутации в адгезивном G-белковом рецепторе E2, а аутосомно-доминантный ауто-воспалительный синдром при холодовой крапивнице, которая обычно сопровождается зудящей/жгучей сыпью после воздействия холода, объясняют активацией ТК и участием IL-1 [5].

Диагноз «идиопатический синдром активации ТК» ставят в случаях, когда у больного не удается идентифицировать триггеры или мутации генов.

Вторичные нарушения ТК (исключая немедленную IgE-опосредованную гиперчувствительность)

Вторичная дисфункция ТК плохо изучена [15]. Возможно, в дальнейшем такие наруше-

ния ТК будут диагностированы как первичные в виде, например, α -триптаземии и ADGRE2-ассоциированной вибрационной крапивницы.

По последним данным, дегрануляция ТК играет также важную роль в патогенезе гипоксических инсультов у новорожденных и детей, патологии глаз (ретинопатия недоношенных), головного мозга (гипоксическая ишемическая энцефалопатия, легких (бронхо-легочная дисплазия) и кровообращения (синдром внезапной детской смерти) [15].

Таким образом, ТК способны реагировать на различные стимулы, в том числе не связанные с IgE, что подтверждает их важную роль при физиологических и патологических состояниях у человека. Определению уровня триптазы (особенно в динамике) следует уделить больше внимания в практике клиницистов. Трудности в интерпретации результатов возникают в случаях, когда ее концентрация остается в пределах нормы (до 11,4 нг/мл), а клинически, возможно, у пациента имеет место мастоцитоз или синдромы активации ТК.

Список литературы / References

1. Akin C. Mast cell activation syndromes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 140, no. 2, pp. 349-55.
2. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J., Le Beau M.M., Bloomfield C.D., Cazzola M., Vardiman J.W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 2016, Vol. 127, no. 20, pp. 2391-2405.
3. Balzar S., Chu H.W., Strand M., Wenzel S. Relationship of small airway chymase-positive mast cells and lung function in severe asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2005, Vol. 171, no. 5, pp. 431-439.
4. Bischoff S. Mast cells in gastrointestinal disorders. *Eur. J. Pharmacol.*, 2016, Vol. 778, pp. 139-145.
5. Boyden S.E., Desai A., Cruse G., Young M.L., Bolan H.C., Scott L.M., Eisch A.R., Long R.D., Lee C.C., Satorius C.L., Pakstis A.J., Olivera A., Mullikin J.C., Chouery E., Mégarbané A., Medlej-Hashim M., Kidd K.K., Kastner D.L., Metcalfe D.D., Komarow H.D. Vibratory urticaria associated with a missense variant in ADGRE2. *N. Engl. J. Med.*, 2016, Vol. 374, pp. 656-663.
6. Broesby-Olsen S. Mastocytosis: urticaria pigmentosa and mastocytosis in the skin. *Global Atlas of Skin Allergy*, 2019, pp. 177-179.
7. Cruse G., Metcalfe D., Olivera A. Functional deregulation of KIT: link to mast cell proliferative diseases and other neoplasms. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2014, Vol. 34, no. 2, pp. 219-237.
8. Elishmereni M., Bachelet I., Nissim Ben-Efraim A., Mankuta D., Levi-Schaffer F. Interacting mast cells and eosinophils acquire an enhanced activation state *in vitro*. *Allergy*, 2013, Vol. 68, pp. 171-179.
9. Marshall J., Portales-Cervantes L., Leong E. Mast cell responses to viruses and pathogen products. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 17, 4241. doi: 10.3390/ijms20174241.
10. Maurer M., Köberle M., Metz M., Biedermann T. Mast cells: Promoters of health and modulators of disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 144, no. 4S, pp. S1-S3.
11. Metcalfe D.D., Peavy R.D., Gilfillan A.M. Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 124, no. 4, pp. 639-646.
12. Normansell R., Walker S., Milan S.J., Walters E.H., Nair P. Omalizumab for asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2014, no. 1, CD003559. doi: 10.1002/14651858.CD003559.pub4.
13. Theoharides T., Valent P., Akin C. Mast cells, mastocytosis, and related disorders. *N. Engl. J. Med.*, 2015, Vol. 373, no. 2, pp. 163-172.

14. Weller K., Ohanyan T., Hawro T., Ellrich A., Sussman G., Koplowitz J., Gimenez-Arnau A.M., Peveling-Oberhag A., Staubach P., Metz M., Maurer M. Total IgE levels are linked to the response of chronic spontaneous urticaria patients to omalizumab. *Allergy*, 2018, Vol. 73, no. 12, pp. 2406-2408.
15. Wilcock A., Bahri R., Bulfone-Paus S., Arkwright P. Mast cell disorders: From infancy to maturity. *Allergy*, 2019, Vol. 74, no. 1, pp. 53-63.
16. Valent P. Diagnosis and management of mastocytosis: an emerging challenge in applied hematology. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2015, Vol. 2015, pp. 98-105.

Автор:

Мачарадзе Д.Ш. — д.м.н., профессор факультета непрерывного медицинского образования, Медицинский институт ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Author:

Macharadze D.Sh., PhD, MD (Medicine), Professor, Faculty of Continuing Medical Education, Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.12.2020

Принята к печати 10.01.2021

Received 29.12.2020

Accepted 10.01.2021

ПЕПТИДЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АГЕНТЫ: ПЛЮСЫ И МИНУСЫ

Чернов А.Н.¹, Орлов Д.С.¹, Шамова О.В.^{1, 2}

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

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Онкологические заболевания представляют серьезную социально-экономическую проблему. Основным подходом к терапии опухолей является их хирургическая резекция, часто дополняемая лучевой и химиотерапией. Эффективность такого комплексного лечения во многих случаях остается невысокой. В связи с этим возникает острая необходимость поиска новых соединений, обладающих селективной цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток и не повреждающих нормальные ткани организма. В обзоре рассматриваются механизмы противоопухолевого действия катионных антимикробных пептидов (АМП) семейства кателицидинов — α -спирального кателицидина человека (LL-37) и пептида с конформацией β -шпильки — протегрина-1 (PG-1) на клетки рака легкого, молочной, поджелудочной, предстательной желез, меланомы, плоскоклеточного рака кожи, полости рта, желудка, яичников, колоректального рака, лейкозов, лимфом, глиом и нейробластом. Обсуждается возможность противоопухолевого и противоположного — проонкогенного действия пептидов и взаимосвязь этих эффектов с иммуномодулирующей активностью АМП на опухоль-ассоциированные макрофаги, естественные киллерные клетки и Т-лимфоциты. Приводятся возможные механизмы селективного действия LL-37 и PG-1 на опухолевые клетки, включающее взаимодействие LL-37 с G-белок-связанными рецепторами: N-формилпептида-2 (FPR2), CXCR2, Mas-ассоциированным с геном X (MrgX2), пуриnergическим (P2Y11), эпидермального (EGFR/Erbb1, ERbb2), инсулино-подобного (IGF1R) факторов роста, лиганд-управляемых ионных каналов (LGIC) и Toll-подобными (TLR) рецепторами, экспрессия которых значительно изменяется в разных типах опухолей по сравнению с нормой. Однако при этом особенно важно учитывать, что терапевтические эффекты LL-37 и его производных могут использоваться только для конкретных типов опухолей. Механизмы действия PG-1 на опухолевые клетки остаются еще плохо изученными, хотя имеющиеся данные свидетельствуют, что протегрин проявляет более однонаправленное действие — повреждает мембраны. Протегрин-1 и LL-37 могут синергически усиливать противоопухолевые эффекты химиопрепаратов и оказывают более выраженное действие на опухолевые, чем на нормальные клетки. Природные АМП представляются перспективными кандидатами на роль новых противоопухолевых средств, которые проявляют активность и в отношении злокачественных метастазирующих, рецидивирующих опухолей с множественной лекарственной устойчивостью. С другой стороны, такие пептиды, как LL-37, проявляют в некоторых случаях свойства, которые могут рас-

Адрес для переписки:

Чернов Александр Николаевич
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (960) 270-43-97.
E-mail: al.chernov@mail.ru

Address for correspondence:

Chernov Alexander N.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (960) 270-43-97.
E-mail: al.chernov@mail.ru

Образец цитирования:

А.Н. Чернов, Д.С. Орлов, О.В. Шамова «Пептиды врожденного иммунитета как потенциальные противоопухолевые агенты: плюсы и минусы» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1285-1306.
doi: 10.15789/1563-0625-POT-2303
© Чернов А.Н. и соавт., 2021

For citation:

A.N. Chernov, D.S. Orlov, O.V. Shamova "Peptides of the innate immunity as potential anticancer agents: pros and cons", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1285-1306.
doi: 10.15789/1563-0625-POT-2303
DOI: 10.15789/1563-0625-POT-2303

смаиваться как проонкогенные, что указывает на необходимость дальнейшего детального изучения молекулярных механизмов их действия на опухолевые клетки.

Ключевые слова: пептиды семейства кателицидинов, LL-37, протегрин-1, опухоль, механизмы противоопухолевого действия, механизмы проонкогенного действия, врожденный иммунитет

PEPTIDES OF THE INNATE IMMUNITY AS POTENTIAL ANTICANCER AGENTS: PROS AND CONS

Chernov A.N.^a, Orlov D.S.^a, Shamova O.V.^{a, b}

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

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

Abstract. Surgical resection was the main approach to cancer therapy, often supplemented by radiation and chemotherapy. The effectiveness of such complex treatment in many cases remains low. In this regard, there is an urgent need to search for new compounds that have selective cytotoxic activity against tumor cells and do not damage normal tissues of the organism. The review discusses mechanisms of antitumor action of cationic antimicrobial peptides (AMPs) of the cathelicidin family - human α -helical cathelicidin (LL-37), and a peptide with β -hairpin conformation — protegrin-1 (PG-1) on lung, breast, pancreas, prostate, squamous skin cancer cells, oral cancer, stomach, ovarian, colorectal cancer, melanoma, leukemia, lymphoma, glioma and neuroblastoma cells. An opportunity of antitumor and pro-oncogenic actions of the peptides and an interplay of these effects with immunomodulatory action of AMPs on tumor-associated macrophages, natural killer cells and T-lymphocytes is discussed. Possible mechanisms of LL-37 and PG-1 selective action upon tumor cells are presented, including the interaction of LL-37 with G-protein-coupled receptors: the N formylpeptide-2 receptor (FPR2), CXC chemokine-2 (CXCR2), Mas-related gene X2 (MrgX2), purinergic (P2Y11), epidermal (EGFR/ErbB1, ERBB2), insulin-like (IGF1R) growth factors, ligand-gated ion channels (LGIC) and Toll-like (TLR) receptors, with expression varying significantly in different types of tumors, as compared to normal tissues. An increase in the level of LL-37 secretion and expression of its CAMP gene are associated with progression of lung adenocarcinoma, breast, pancreas, and prostate cancer, ovarian cancer, melanoma, and squamous cell carcinoma of the skin. In contrast, CAMP expression and LL-37 secretion are significantly reduced in gastric cancer cells, oral squamous cell cancer, colorectal cancer, leukemia, lymphomas, gliomas, and SH-SY5Y neuroblastoma. Therefore, therapeutic effects of LL-37 can only be used for specific types of tumors. The mechanisms of action of PG-1 on tumor cells are still poorly understood, although the available data indicate that protegrin exhibits a more unidirectional effect, i.e., it damages cell membranes. Protegrin-1 and LL-37 can synergistically enhance the antitumor effects of chemotherapy drugs and have a more pronounced effect on tumor cells, than upon normal cells. Natural AMPs appear to be promising candidates for the role of new antitumor agents, which are also active against malignant metastatic, recurrent multidrug-resistant tumors. On the other hand, peptides such as LL-37, in some cases, exhibit properties that can be considered pro-oncogenic, which indicates a need for further detailed studies on the molecular mechanisms of their action on tumor cells.

Keywords: cathelicidin family, LL-37, protegrin-1, tumor, antitumor mechanisms, protooncogenic effects, innate immunity

Введение

Онкологические заболевания представляют серьезную социально-экономическую проблему. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Международного агентства по изучению рака — Globocan в мире в 2018 г. зарегистрировано 18078957 новых случаев онкологических заболеваний, из которых 9555027 случаев закончились летальным исходом (53%) [50]. По

прогнозам ВОЗ к 2040 г показатели заболеваемости и смертности от рака увеличатся на 70% и составят соответственно 29,5 и 16,4 млн случаев [50].

Основным подходом к терапии опухолей является их хирургическая резекция, часто дополняемая лучевой и химиотерапией. К сожалению, эффективность такого комплексного лечения во многих случаях остается невысокой. Например,

5-летняя выживаемость пациентов с наиболее распространенными новообразованиями — раком легкого и молочной железы составляет, соответственно, 4 и 26% [77]. Одной из основных причин недостаточной эффективности лечения является неселективное действие химиопрепаратов, в результате которого гибнут не только опухолевые, но и нормальные высокопролиферирующие клетки (эпителиоциты и клетки красного костного мозга), что приводит к существенному ухудшению состояния здоровья пациентов. Другая проблема связана с развитием в опухолевых и стволовых клетках феномена множественной лекарственной устойчивости (MDR), что определяет неэффективность терапии, возникновение метастазов и рецидивов опухолей у пролеченных пациентов [2, 29, 95].

В связи с этим возникает острая необходимость поиска новых соединений, обладающих селективной цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток, не вызывающих развития MDR и не повреждающих нормальные (здоровые) ткани организма. В качестве потенциальных кандидатов на роль таких лекарственных средств могут рассматриваться эндогенные катионные пептиды, называемые антимикробными пептидами (АМП), системы врожденного иммунитета человека и животных [113]. На сегодняшний день известно более 5000 АМП [123]. Большинство АМП — это молекулы, включающие 12-50 аминокислотных остатков с высоким содержанием аргинина и/или лизина. Хотя первоначально пептиды были названы антимикробными, как соединения, которым свойственна антибиотическая активность в отношении бактерий, одноклеточных грибов, простейших и вирусов, как оказалось, многие АМП обладают иммуномодулирующим, митогенным, ранозаживляющим действием, в то время как некоторые пептиды — противоопухолевой активностью [31, 49, 89]. АМП имеют различные структуры, наличие и выраженность того или иного эффекта зависит от структурных особенностей каждого пептида. Некоторые АМП проявляют значительную цитотоксическую активность против неопластических клеток, резистентных к применяемым в медицине противоопухолевым препаратам. Такие соединения представляются перспективными кандидатами на роль новых средств терапии онкологических заболеваний, поэтому актуальной задачей экспериментальной медицины является детальное исследование механизмов противоопухолевой активности АМП человека и млекопитающих, анализ их многообразных биологических эффектов, разработка новых синтетических аналогов природных пептидов для получения соединений с оптимальными для применения в

медицине свойствами и установление мишеней их цитотоксического действия.

В данном обзоре обсуждаются механизмы противоопухолевого действия двух структурно различных пептидов семейства кателицидинов: α -спирального кателицидина человека LL-37 и пептида с конформацией β -шпильки — протеогрина 1 (PG-1) нейтрофилов свиньи.

Структурные особенности пептидов LL-37 и PG-1

Два отличающихся по структуре пептида объединены в одно семейство на основании сходства молекул их белков предшественников. Белки-предшественники всех АМП семейства кателицидинов включают высококонсервативную область — кателиновый домен (около 100 аминокислот), а также вариабельный участок (пептидный домен). В частности, единственный представитель семейства кателицидинов у человека — пептид LL-37 представляет собой катионный амфифильный АМП (молекулярная масса 4,5 кДа), содержащий 37 аминокислот (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES), в том числе два N-концевых остатка лейцина, вследствие чего и получил свое название. Этот пептид образуется из белка-предшественника, имеющего молекулярную массу 18 кДа — hCAP-18, кодируемого геном CAMP, в результате протеолитического расщепления данного белка сериновой протеиназой-3 между остатками аланина и лейцина [24, 66, 87, 101]. Интересно, что протеиназа гастриксин (пепсин C), попадая во влагалищную жидкость, при низком pH также процессирует hCAP-18 до функционально активной формы LL-37 [101]. Исследования с применением ядерного магнитного резонанса показали, что LL-37 имеет α -спиральную конформацию в мембранах клеток и формирует олигомеры в липидном окружении или в водном растворе при высокой концентрации пептида, что препятствует его протеолитической деградации [49, 66, 85].

Протеогрин-1 также относится к семейству кателицидинов и представляет собой катионный АМП из 18 аминокислот (RGGRLCYCRRRFCVVCVGR-NH₂), имеющий β -шпильчатую структуру, стабилизированную двумя дисульфидными связями. Впервые PG-1 и две его изоформы — PG-2 и PG-3 — были обнаружены в нейтрофилах свиньи *Sus scrofa*, а к настоящему времени идентифицировано 5 изоформ протеогринов [62, 103].

Локализация LL-37 и PG-1 в клетках

Оба рассматриваемых пептида содержатся в клетках, выполняющих защитные функции. Так, LL-37 локализуется во вторичных гранулах нейтрофилов и эпителиальных клетках яичка, шейки

матки, дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и др., а также в небольших количествах присутствует в макрофагах, моноцитах, тучных и дендритных клетках, естественных киллерах, лимфоцитах, миелоидных клетках костного мозга, кератиноцитах кожи, в слезной жидкости, слюне и других биологических жидкостях [2, 7, 12, 39, 48, 49, 80, 83, 100, 110].

Экспрессия гена *SAMP* в большинстве эпителиальных клеток является конститутивной, однако в кератиноцитах она индуцируется бактериальной инфекцией, компонентами бактериальных клеток, например липополисахаридами, фактором некроза опухоли- α (TNF α), витамином D, бутиратом, некоторыми короткоцепочечными жирными кислотами [43, 106]. Интересно, что LL-37 также обнаружен в опухолях: эпителиальной аденокарциноме легкого (A549), эпителиоидной карциноме (A431), EBV-трансформированных В-клетках, в клетках острого миелоидного лейкоза (HL-60, MG63), эритромиелолойкоза (K562), лимфомы (U937), гепатомы (Hep22a) и в эпителиальных клетках рака толстой кишки (HT-29) [6, 66].

Протегрины не имеют столь широкой локализации и содержатся лишь в специфических гранулах нейтрофилов.

В последнее время установлено, что АМП могут не только продуцироваться и секретироваться разнообразными клетками во внеклеточное пространство, но и проникать затем в различные клетки организма, тем самым оказывая влияние на процессы их жизнедеятельности.

Эффекты LL-37 и PG-1 на опухолевые и нормальные клетки

Кателицидин LL-37 проявляет цитотоксическую активность в отношении клеток SAS-H1 плоскоклеточного рака полости рта, нетрансформированных эндотелиоцитов и лимфоцитов, но не оказывает цитотоксического действия на фибробласты десны и линию клеток HaCaT кератиноцитов человека [49, 56, 84]. Когда пептид был впервые описан, его основной функцией считалась антимикробная. LL-37 проявляет антимикробное действие в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий в микромолярных концентрациях [49]. Впоследствии было показано, что в низких концентрациях (нано-, пикомолярных) LL-37 стимулирует хемотаксис нейтрофилов, моноцитов, дендритных и Т-клеток, ангиогенез, пролиферацию, миграцию эпителиальных клеток и секрецию цитокинов [49, 98, 111]. Эти процессы способствуют заживлению ран, регенерации тканей и поддержанию гомеостаза, что играет важную роль для реализации защитных функций, но может быть ассоциировано с развитием рака при протекании

хронических инфекций, воспалительного процесса, так как повышает способность опухолевых клеток к миграции, инвазии и стимулирует ангиогенез. Наличие этих свойств указывает на неоднозначность эффектов пептида: с одной стороны, он обладает цитотоксическим действием на опухолевые клетки, с другой — проявляет ряд эффектов, позволяющих предположить участие LL-37 в канцерогенезе [66, 87]. Показано, что пептид регулирует апоптоз и остановку клеточного цикла, что в ситуации дисбаланса между апоптозом и пролиферацией может способствовать образованию опухолей [87, 93].

Протегрин-1 оказывает цитотоксическое действие на большинство опухолевых клеток и обладает низкой цитотоксичностью в отношении нетрансформированных фибробластов и ряда других клеток, в частности макрофагов 3D4/2 [103]. Однако, как установлено в экспериментах *in vitro*, он может в бессывороточной среде повреждать нормальные клетки крови человека — эритроциты, лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, хотя в присутствии компонентов сыворотки крови эти эффекты существенно менее выражены [6]. Протегрины проявляют высокую антимикробную активность в отношении широкого спектра микроорганизмов: грамположительных, грамотрицательных бактерий, грибов, а также вирусов [62, 124]. Иммуномодулирующее действие PG-1 может реализоваться через дегрануляцию тучных клеток (обсуждается ниже) [42].

Механизмы взаимодействия LL-37 и PG-1 с опухолевыми клетками

Избирательность действия LL-37 и PG-1 на опухолевые клетки объясняется отличием липидного, белкового состава мембран неопластических клеток от состава мембран нормальных клеток. Мембраны опухолевых клеток имеют высокий отрицательный заряд вследствие наличия относительно большого количества кислых фосфолипидов (фосфатидилсерина), сиалированных гликопротеинов, гликолипидов и О-гликозилированных муцинов [32, 51, 126]. Причиной увеличенного содержания гликозилированных компонентов в мембранах является нарушение экспрессии генов гликозилтрансфераз [34]. Кроме того, повышенное содержание фосфатидилсерина, сиаловых кислот в мембранах опухолевых клеток приводит к возрастанию текучести вследствие менее плотной упаковки липидов, которая увеличивает их чувствительность к катионным LL-37 и PG-1 [72]. Исследования показали, что ферментативное расщепление остатков сиаловых кислот на мембранах опухолевых клеток уменьшает противоопухолевое действие катионных АМП [32]. Таким образом, критически важным для селективного

действия LL-37, PG-1 и других пептидов по отношению к опухолевым клеткам является электростатическое притяжение между молекулами положительно заряженных АМП и отрицательно заряженными мембранами клеток [49, 66, 97]. Однако в мембранах опухолевых клеток может наблюдаться повышенное содержание холестерина, которое увеличивает жесткость мембран и препятствует проявлению противоопухолевого действия α -спиральных пептидов, в частности LL-37 [28, 99]. С другой стороны, модификации состава мембран опухолевых клеток могут способствовать изменению адгезивности, их «маскировке» от иммунной системы, нарушению каскадов пролиферации и дифференцировки [2].

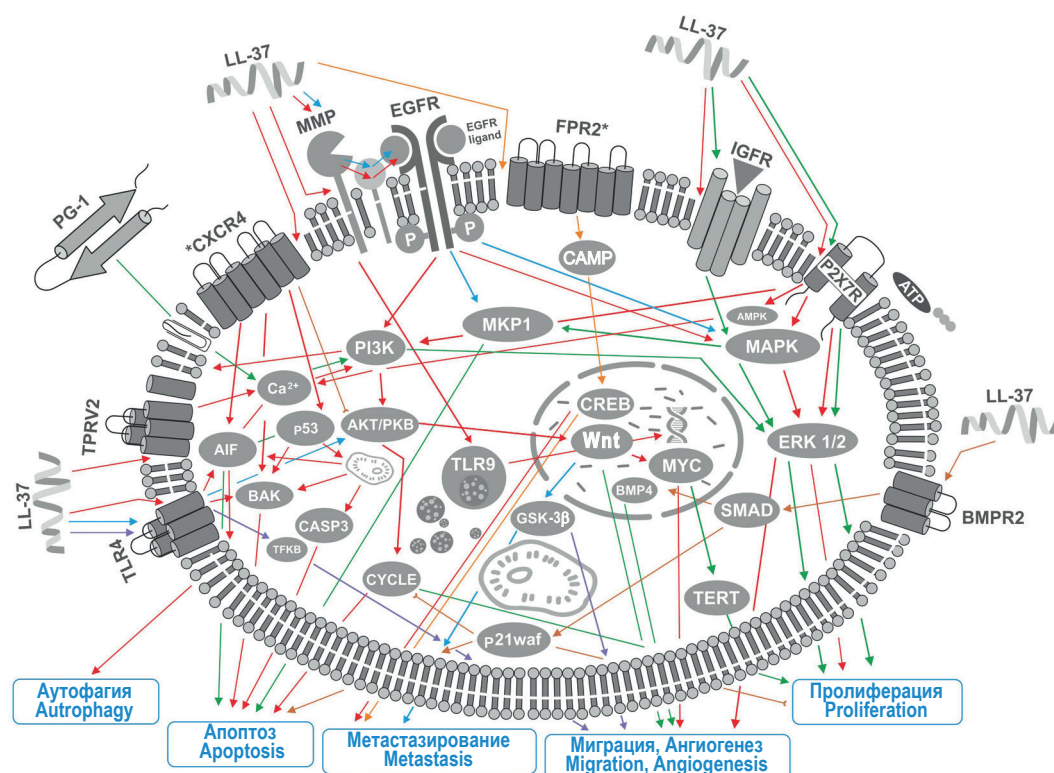
Исследования, проведенные на культуре A549 эпителиальных клеток легких человека с применением брефельдина А и нокадазола (соответственно, ингибиторов эндоцитоза и полимеризации микротрубочек), показали, что проникновение LL-37 внутрь клеток может происходить также путем эндоцитоза, а внутриклеточный транспорт пептида к ядру опосредуется микротрубочками [68]. Активация эндоцитоза LL-37 наблюдается при его связывании с участком мембраны, где локализуются G-белок-связанные FPR2 рецепторы.

В последние годы показано, что взаимодействие LL-37 с мембранами (опухолевых и нормальных) клеток может быть не только электростатическим, но и обусловленным его связыванием с определенными рецепторами. Установлено, что LL-37 может связываться с трансмембранными доменами нескольких мембранных рецепторов, что объясняет разнообразие его эффектов в отношении разных типов клеток. LL-37 взаимодействует с P2X7 пуриnergическим метаботропным и четырьмя типами G-белок-связанных рецепторов (GPCR): рецептором N-формилпептида-2 (FPR2), CXCR2 хемокина-2 (CXCR2), Mas-ассоциированным с геном X (MrgX2), пуриnergическим (P2Y11) рецепторами [1, 21]. Активация P2X7 стимулирует секрецию провоспалительных интерлейкинов IL-1 β и IL-8 [37, 78], полиморфизм генов, которых ассоциирован с развитием опухолей [41, 61]. Также LL-37 неспецифически связывается с рецепторными тирозинкиназами (RTK): рецепторами-1, рецепторами-2 эпидермального фактора роста (EGFR/ErbB1, ERBB2) и инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1R) (рис. 1) [21]. Взаимодействие LL-37 с IGF1R индуцирует пролиферацию и метастазирование опухолей через β -аррестин-1-зависимую активацию MAPK/ERK каскада (рис. 1) [42, 57]. LL-37 может взаимодействовать не столько с сайтами связывания лигандов данных рецепторов, сколько с трансмембранными

доменами лиганд-управляемых ионных каналов (LGIC) и Toll-подобных рецепторов (TLR) [21]. Последние подразделяются на мембранные: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 и эндосомальные: TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 [70]. В результате взаимодействия пептида с перечисленными рецепторами активируются внутриклеточные белки: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) [21], апоптотические Bax, AIF белки и снижается активность теломеразы, как предполагается, через взаимодействие с G-квадруплексом теломеразы [53]. Кроме того, связывание пептида с TLR1, TLR2, TLR4 или ко-рецептором CD14 снижает развитие провоспалительного ответа, опосредованного этими рецепторами.

Помимо механизмов, запускающих внутриклеточные каскады, показано, что в присутствии LL-37 повышается экспрессия CD86, CD103, CD141 молекул, что, по мнению Findlay и соавт., происходит через активацию основного ATF-подобного транскрипционного фактора 3 — белка типа лейциновой молнии (BTLA) и маркеров — белка A семейства-9, содержащего C-типа лектинный домен (CLEC9A) и X-C мотив-содержащего хемокинового лиганда-1 (CXCR1) на дендритных клетках и их дифференцировку при совместном использовании с гранулоцит-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF). Такие зрелые дендритные клетки усиливают активацию и пролиферацию цитотоксических CD8⁺-Т-лимфоцитов, секрецию ими цитокинов и гранзимов, обеспечивающих противоопухолевую защиту [38].

Для мембраноактивного пептида PG-1 не показано столь широкого спектра иммуномодулирующих эффектов, наиболее хорошо изучены его антимикробные и противоопухолевые свойства. PG-1 в результате электростатических взаимодействий связывается с мембранами опухолевых клеток. Именно электростатическое взаимодействие между остатками аргинина PG-1 и фосфатными группами фосфолипидов, а также другими отрицательно заряженными компонентами мембран, оказывается решающим для реализации его цитотоксических эффектов [103], хотя гидрофобные свойства этого пептида также играют важную роль для его встраивания в липидные мембраны. При взаимодействии PG-1 с липидным бислоем происходит его олигомеризация с образованием трансмембранных каналов (пор) [75, 95]. Поэтому отличия в липидном составе мембран различных типов опухолей и нормальных клеток могут обуславливать и различную цитотоксическую активность PG-1 [52]. По некоторым данным, проникновение PG-1 и его синтетических линейных аналогов SynB3 и SynB5 в клетки происходит путем эндоцитоза через их интернализацию в



- Рак предстательной железы / Prostate cancer
- Рак молочной железы / Breast cancer
- Рак легкого / Lung cancer
- Меланома кожи / Melanoma of the skin
- Рак яичников / Ovarian cancer
- Колоректальный рак / Colorectal cancer

- * CXCR4, FPR2 – относится к G-белок связанным рецепторам.
- * CXCR4, FPR2 – refers to G-protein-coupled receptors.

Митохондрия / Mitochondria

Ангиогенез / Angiogenesis; Апоптоз / Apoptosis; Аутофагия / Autophagy; Колоректальный рак / Colorectal cancer; Меланома кожи / Melanoma of the skin; MMP – металлопротеиназы / Metalloproteinases; Метастазирование / Metastasis; Миграция / Migration; Митохондрия / Mitochondria; Пролиферация / Proliferation; Рак легкого / Lung cancer; Рак молочной железы / Breast cancer; Рак предстательной железы / Prostate cancer; Рак яичников / Ovarian cancer; AIF – апоптоз-индуцирующий фактор / Apoptosis-inducing factor; AKT/PKB – протеинкиназа Б / Protein kinase B; AMPK – АМФ-активируемая протеинкиназа / AMP activated protein kinase; ATP – АТФ-аденозинтрифосфат / Adenosine triphosphate; BAK – Bcl-2 подобный антагонист-киллер / Bcl-2 homologous antagonist killer; BMP4 – костноморфогенетический белок-4 / Bone morphogenetic protein-4; BMPR2-рецептор 2 костномозгового белка / Bone marrow protein receptor 2; Ca²⁺-кальций / Calcium; CAMP – циклический аденозинмонофосфат / cyclic adenosine monophosphate; CASP3 – каспаза-3 / Caspase-3; CREB – белок, связывающийся с цАМФ-элементом ответа / CAMP response element-binding protein; CXCR4 – хемокиновый рецептор 4 / Chemokine receptor 4; CYCLE – циклин E / Cyclin E; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста / Epidermal growth factor receptor; ERK 1/2 – киназа 2, регулируемая внеклеточными сигналами / Extracellular signal-regulated kinase 2; GSK-3β – гликоген-синтаза киназа 3 бета / Glycogen synthase kinase-3 beta; LL-37 – кателицидин LL-37 / Cathelicidin LL-37; IGFR – рецептор инсулино-подобного фактора роста / Insulin-like growth factor receptor; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа / Mitogen-activated protein kinase; MKP1 – митоген-активируемая протеинкиназа-1 / Mitogen-activated protein kinase 1; MYC – транскрипционный фактор / Transcription factor; p21waf – белок p21 / p21 protein, cyclin-dependent kinase inhibitor 1; p53 – белок p53 / p53 protein; P2X7R – пуринергический рецептор / Purinergic receptor; PG-1 – протегрин-1 / Protetgrin PG-1; PI3K – фосфоинозитол-3-киназа / Phosphoinositol-3-kinase; SMAD – структурно сходные белки / Structurally similar proteins; TERT – обратная транскриптаза теломеразы / Telomerase reverse transcriptase; TFKB – ядерный фактор κB / nuclear factor κB; TLR4 – Toll-подобный рецептор 4 / Toll-like receptor 4; TLR9 – Toll-подобный рецептор 9 / Toll-like receptor 9; TPRV2 – рецептор 2 подсемейства V, активируемый переменным потенциалом / Transient receptor potential cation channel subfamily V member 2; Wnt – белок сигнальной трансдукции / Wingless signaling pathway

Рисунок 1. Сигнальные пути кателицидина LL-37 и протегрина-1 (PG-1) в опухолевой клетке

Figure 1. Signaling pathways of cathelicidin LL-37 and protegrin-1 (PG-1) in a tumor cell

составе эндосом [33]. Нами получены данные, свидетельствующие, что, наряду с переносом PG-1 с помощью эндоцитоза, имеет место и независимое от эндоцитоза проникновение пептида через мембрану клеток [5]. В относительно высоких концентрациях (5–30 мкМ) пептид вызывает существенные повреждения клеточных мембран, что приводит к быстрой гибели клеток (в течение 5–10 мин) по типу некроза [6]. В более низких концентрациях (1,5–2,5 мкМ) пептид может инициировать процесс апоптоза через формирование трансмембранных пор, приводящих к индукции Ca^{2+} потока внутрь клетки, что запускает процессы, в конечном счете приводящие к активации белка p53 и каспаз [17, 95]. Интересно, что есть данные о том, что в тучных клетках PG-1 связывается с MrgX2 рецептором [44], а в энтероцитах IPEC-J2 свиньи — пептид взаимодействует с трансмембранными доменами IGF1R и EGFR рецепторов [5], активируя их, что приводит к усилению миграции клеток кишечника. Как предполагается, механизмы проапоптотического действия PG-1 опосредовано реализуются в том числе и через индукцию экспрессии белка p53, который, являясь транскрипционным фактором, активирует экспрессию апоптотических генов, таких как *CDKN1A* (ингибитор циклинзависимой киназы 1A или p21). В свою очередь, белок p21 ингибирует экспрессию ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA). В результате экспрессии этих генов и повышения уровня кодируемых ими белков наблюдается ингибирование прохождения клеточного цикла из G_1 в S-фазу, что блокирует деление раковых клеток и рост опухоли [74, 119].

Однако Hussin A. Rothan и соавт. наблюдали, что в результате обработки PG-1 клеток MCF-7 рака молочной железы имеет место повышение экспрессии онкогенов *MYC* и *erbB2*, что способствует активации теломеразы, репарации повреждений ДНК и пролиферации раковых клеток [16, 76, 95].

Механизмы действия LL-37 на клетки рака легкого

Кателицидин LL-37 обнаружен в эпителиоцитах и слизистых клетках подслизистых желез легких, причем экспрессия его гена повышается при регенерации эпителиальных клеток и раке легкого [54, 66, 109]. В присутствии LL-37 снижается экспрессия гена интерлейкина-32 (*IL32*) в клетках рака легкого, которая ассоциирована с увеличением концентрации матриксных металлопротеиназ-2, -9 (MMP-2 и MMP-9) и инвазивным, метастатическим потенциалом первичной аденокарциномы легкого [102, 122]. По мнению Chen и соавт., пептид LL-37 таким образом снижает IL-32-индуцированную секрецию провоспалительных

цитокинов: $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IL-1}\beta$, стимулирует продукцию антагониста рецептора интерлейкина IL-1ra через Rho, Ras-ГТФаза независимый путь и активность митоген-активируемой протеинкиназы (p44/42MAPK), MKP1, что в итоге запускает апоптоз раковых клеток (табл. 1) [21].

Однако, с другой стороны, предполагается, что LL-37 также может действовать как митоген и стимулировать пролиферацию раковых клеток бронхов. Установлена значимая корреляция между его уровнем в крови и прогрессированием аденокарциномы или плоскоклеточного рака легкого [66, 112]. Такой митогенный эффект LL-37 в низких концентрациях (5 нг/мл) реализуется через связывание пептида с трансмембранным доменом матриксных металлопротеиназ, что приводит к их активации и далее расщеплению ими заякоренных в мембране гепарин-связывающих EGF, которые, высвобождаясь, связываются и активируют рецепторы EGFR, запускающие MAPK каскад (табл. 2, рис. 1) [109, 122]. Применение ингибиторов EGFR — AG1478 и MEK — PD98059 и U1260 сильно подавляет LL-37-опосредуемую пролиферацию клеток рака легкого [113].

На модели опухолевого процесса у мышей, нокаутированных по гену *CAMP*, которым трансплантировали клетки немелкоклеточного рака легкого, показано, что LL-37 посредством связывания с трансмембранным доменом Toll-подобного рецептора-4 (TLR4) активирует его по «не-каноническому» пути через протеинкиназу B (AKT) и Wnt/ β -катенин/GSK-3 β каскады, которые стимулируют пролиферацию раковых клеток. Кроме того, предполагается, что LL-37 через активацию Wnt/ β -катенинового каскада повышает уровень РНК-связывающего белка тристе-трапролина (табл. 2, рис. 1) [54].

Механизмы действия LL-37 и PG-1 на клетки рака молочной железы

Кателицидин LL-37 секретируется клетками эпителия молочной железы [10], причем усиление экспрессии его гена наблюдается в малигнизированных клетках [46]. Установлено, что уровень LL-37 в крови положительно коррелирует со стадией рака (> 5 нг/мл общего белка) и плохим прогнозом [18, 46]. Причем экспрессия мРНК LL-37 в клетках рака молочной железы ассоциирована с наличием метастазов в лимфатические узлы [73]. При взаимодействии LL-37 с ErbB2 рецептором наблюдается стимуляция герегулин (лиганд ErbB3/ErbB4)/MAPK и MEK-опосредованной пролиферации, миграции, инвазии и метастазирования клеток рака молочной железы (табл. 1) [66, 109, 116]. Кроме того, показано, что LL-37 связывается с трансмембранным доменом G-белок-связанного рецептора 2-формилпептида (FRP2, FPRL1), что стимулирует

ТАБЛИЦА 1. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ LL-37 В КЛЕТКАХ РАЗНЫХ ТИПОВ РАКА
TABLE 1. ANTITUMOR MECHANISMS OF LL-37 ACTION IN DIFFERENT TYPES OF CANCER CELLS

Тип опухоли, клеточная линия Type of tumor, cell line	Рецептор Receptor	Сигнальный путь Signalling pathway	Гены Genes	Эффект Effect	Источник Reference
Аденокарцинома легкого Lung adenocarcinoma	–	NF-κB, p44/42 MAPK, MKP1 Ингибирует секрецию TNFα, IL-1β; активирует секрецию IL-1ra NF-κB, p44/42 MAPK, MKP1 Inhibits the secretion of TNFα, IL-1β; activates the secretion of IL-1ra	Ингибирование экспрессии IL-32, MMP2, MMP9 Inhibition of expression IL-32, MMP2, MMP9	Ингибирование пролиферации раковых клеток, инвазии, метастазирование Inhibition of cancer cell proliferation, invasion, metastasis	[21, 102, 122]
Плоскоклеточный рак полости рта Oral cavity squamous cell carcinoma	–	–	Метилирование промотора <i>CAMP</i> гена Methylation the promoter of <i>CAMP</i> gene	–	[20]
Клетки SAS-H1 плоскоклеточного рака полости рта SAS-H1 oral squamous cell carcinoma cells	–	Деполаризация мембран митохондрий и каспаза-3, каспаза-9 независимый апоптоз Depolarization of mitochondrial membranes and caspase-3, caspase-9 independent apoptosis	–	Стимуляция апоптоза Stimulation of apoptosis	[84]
Рак желудка Stomach cancer	BMPR2	Активация: BMP4, p21Waf1/Cip1, Smad1/5/8 Smad4 белки, ингибирование: циклина E2, протеасома Activation: BMP4 p21Waf1/Cip1, Smad1/5/8 Smad4 proteins, inhibition: cyclin E2, proteasome	–	Апоптоз, остановка клеточного цикла в G0/G1 фазе, ингибирование пролиферации Apoptosis, cell cycle arrest in G0/G1 phase, inhibition of proliferation	[117, 118]
Рак желудка Stomach cancer	FPRL1	–	–	Ингибирование ангиогенеза активация натуральных киллеров (NKs) и типа-1 CD4 ⁺ T-лимфоцитов Inhibition of angiogenesis, activation of natural killer cells (NKs) and type-1 CD4 ⁺ T lymphocytes	[88, 121]

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Тип опухоли, клеточная линия Type of tumor, cell line	Рецептор Receptor	Сигнальный путь Signalling pathway	Гены Genes	Эффект Effect	Источник Reference
Рак желудка Stomach cancer	–	Ингибирование секреции IL-32, TNF α , IL-6, активация p44/42 MAPK и MKP1 Inhibition of the secretion of IL-32, TNF α , IL-6, activation of p44/42 MAPK and MKP1	–	–	[87]
Клетки НСТ116 колоректального рака Colorectal cancer cells HCT116	G-белок связанный рецептор (GPCR) G-protein coupled receptor (GPCR)	Каскад апоптотических факторов AIF, Bax, Bak, Puma, p53, AIF, Bax, Bak, Puma, p53, endonuclease G (EndoG), ингибирование Bcl-2 Cascade of apoptotic factors AIF, Bax, Bak, Puma, p53, endonuclease G (EndoG), inhibition of Bcl-2	–	Ингибирование пролиферации и индукция каспазо-независимого апоптоза Inhibition of proliferation and induction of caspase-independent apoptosis	[11, 65, 92, 93]
Клетки НСТ116 колоректального рака Colorectal cancer cells HCT116	Ингибирование экспрессии хемокинового CXCR4 рецептора 4 (CXCR4) Inhibition of the expression of the chemokine CXCR4 receptor 4 (CXCR4)	Активация микроРНК miR-663a, белка p21 и Akt Activation of microRNA miR-663a, protein p21 and Akt	–	Остановка G2/M перехода в раковых клетках Stopping the G2/M transition in cancer cells	[64]
Рак яичников Ovarian cancer	–	Экспрессия интерферона- γ (IFN γ) продуцентами дендритными клетками Expression of interferon- γ (IFN γ) production of interferon- α by plasmacytoid dendritic cells	–	Активация CD1 $^{+}$ NK1-клеток и F4/CD80 $^{+}$ макрофагов, ингибирующих рост раковых клеток Activation of CD1 $^{+}$ NK1 cells and F4/CD80 $^{+}$ macrophages, inhibiting the growth of cancer cells	[24, 67]
Опухолевая Jurkat Т-клеточная линия Jurkat tumor T cell line	–	Повышение внутриклеточного Ca $^{2+}$, деполаризация мембран митохондрий и активация кальпаинов, Bax, AIF Increased intracellular Ca $^{2+}$, depolarization of mitochondrial membranes and activation of calpains, Bax, AIF	–	Активация каспазо-независимого апоптоза Activation of caspase-independent apoptosis	[73]

Примечание. Знак – указывает на неизвестный рецептор, сигнальный путь или ген.

Note. – Sign indicates an unknown receptor, signalling pathway or gene

ТАБЛИЦА 2. ПРООНКОГЕННЫЕ МЕХАНИЗМЫ LL-37 В КЛЕТКАХ РАЗНЫХ ТИПОВ РАКА
TABLE 2. PRO-ONCOGENIC MECHANISMS OF LL-37 IN DIFFERENT TYPES OF CANCER CELLS

Тип опухоли, клеточная линия Type of tumor, cell line	Рецептор Receptor	Сигнальный путь Signalling pathway	Гены Genes	Эффект Effect	Источник Reference
Аденокарцинома плоскоклеточный рак легкого Squamous cell lung cancer adenocarcinoma	Трансактивация EGFR Transactivation of EGFR	Активация MAPK Activation of MAPK	–	Пролиферация раковых клеток, прогрессирование Cancer cell proliferation, progression	[66, 109, 112]
Немелкоклеточный рак легкого Non-small cell lung cancer	Трансактивация TLR4 Transactivation of TLR4	Протеинкиназа В (АКТ), Wnt/ β -catenin-GSK-3 β Protein kinase B (AKT), Wnt/ β -catenin-GSK-3 β	–	Пролиферация раковых клеток Cancer cell proliferation	[54]
Рак молочной железы Breast cancer	ErbB2	Геретулин (лиганд ErbB3/ErbB4)-МАРК и MEK heregulin (ErbB3/ErbB4 ligand)-MAPK and MEK	–	Пролиферация, миграция, инвазия, метастазирование Proliferation, migration, invasion, metastasis	[66, 109, 116]
Рак молочной железы Breast cancer	Трансактивация EGFR через FRP2 (FPRL1) Transactivation of EGFR through FRP2 (FPRL1)	–	–	Хемотаксис мигрирующих клеток и ангиогенез Migratory cell chemotaxis and angiogenesis	[108]
MCF7, MDA-MB-435s и MDA MB-231 рака молочной железы MCF7, MDA-MB-435s and MDA MB-231 breast cancer	TRPV2	Активация внутриклеточного потока Ca ²⁺ и PI3K/Akt Activation of intracellular flow of Ca ²⁺ and PI3K/Akt	–	Миграция опухолевых клеток Migration of tumor cells	[36, 40]
SKBR3 рака молочной железы SKBR3 breast cancer	–	–	TERT, (FOXD3, UTF1)	Стволовость опухолевых клеток Stemness of tumor cells	[82]
Меланома кожи Melanoma of the skin	Трансактивация TLR4 Transactivation of TLR4	NF- κ B-путь NF- κ B pathway	–	Миграция и пролиферация Migration and proliferation	[79, 87, 107]

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Тип опухоли, клеточная линия Type of tumor, cell line	Рецептор Receptor	Сигнальный путь Signalling pathway	Гены Genes	Эффект Effect	Источник Reference
A375 и A875 клеточные линии меланомы A375 and A875 melanoma cell lines	–	NF-κB, YB-1-сигнальные пути NF-κB, YB-1 signaling pathways	–	Пролиферация, миграция инвазия и метастазирование клеток Proliferation, migration, invasion and metastasis of cells	[21, 55, 93]
Клетки A431 плоскоклеточного рака кожи A431 squamous cell skin cancer cells	–	ДНК-связывающий белок A (dbpA), NF-κB DNA binding protein A (dbpA), NF-κB	–	Пролиферация, инвазия Proliferation, invasion	[21, 114]
Аденокарцинома протоков поджелудочной железы Pancreatic duct adenocarcinoma	Рецепторы FPR2, P2X7 Receptors FPR2, P2X7 P2X7R transactivation	–	–	Пролиферация стволовых раковых клеток, прогрессия опухоли Cancer stem cell proliferation, tumor progression	[96]
Рак предстательной железы Prostate cancer	Трансактивация P2X7R Transactivation of P2X7R	Активация Erk 1/2, PI3K/Akt, Snail, E-скадгерин и MMP-3 сигнальных путей Activation Erk 1/2, PI3K/Akt, Snail, E-cadherin and MMP-3 signaling pathways	–	Пролиферация, инвазия и метастазирование раковых клеток Proliferation, invasion and metastasis of cancer cells	[30, 47, 91]
Рак яичников Ovarian cancer	FPR2 (FPR1)	Аденилатциклязный сигнальный путь Adenylate cyclase signaling pathway	–	Рекрутирование мезенхимальных стромальных стволовых клеток, инвазия, прогрессия Recruitment of mesenchymal stromal stem cells, invasion, progression	[26]
Рак яичников Ovarian cancer	–	1,25-дигидроксивитамин D₃ 1,25-dihydroxyvitamin D ₃	Индукцирует экспрессию гена CAMP Induces the expression of the CAMP gene	–	[106]

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

хемотаксис мигрирующих раковых клеток и ангиогенез опухоли (табл. 1) [108]. В экспериментах на клеточных линиях рака молочной железы MCF-7, MDA-MB-435s и MDA-MB-231 получены данные, указывающие, что LL-37 индуцирует миграцию опухолевых клеток через альтернативный путь: рецептор (TRPV2), Ca^{2+} приток и PI3K/Akt сигнальный путь (табл. 1, рис. 1) [36, 40]. При этом LL-37 специфически не взаимодействует с TRPV2 рецептором, а его активация, видимо, происходит в результате модификации липидного бислоя мембраны под действием пептида [21]. Также на клеточной линии SKBR3 рака молочной железы установлено, что в присутствии LL-37 повышается экспрессия генов стволовых клеток: обратной транскриптазы теломеразы (ревертаза *TERT*), forkhead box-D3 (*FOXD3*) и транскрипционного фактора недифференцированных эмбриональных клеток-1 (*UTF1*) [82].

Протегрин-1 проявляет противоопухолевую активность в отношении клеток карциномы молочной железы (MCF-7) и нормальных эпителиальных клеток молочной железы (MCF-10A) [95]. Этот цитотоксический проапоптотический эффект PG-1 на MCF-7 клетки обусловлен его олигомеризацией в клеточных мембранах, в результате которой происходит формирование трансмембранных пор, индукция внутриклеточного притока в клетки Ca^{2+} , активация белков, инициирующих процесс апоптоза или участвующих в его реализации, в частности p53 белка и каспазы-3 [95].

Механизмы действия LL-37 на клетки меланомы и плоскоклеточного рака кожи

Меланома кожи

Кателицидин LL-37 активно синтезируется и секретируется клетками кожи человека [39]. Однако его концентрация и уровень экспрессии гена существенно повышены в клетках злокачественной меланомы и ассоциированы с прогрессией опухоли [59]. При этом не было обнаружено различий в экспрессии гена *CAMP* среди подтипов меланомы и поэтому экспрессия гена *CAMP* не может быть использована в качестве прогностического маркера для дифференциального диагноза у пациентов с меланомой [59]. Возможно, что такой проонкогенный и провоспалительный эффект LL-37 связан с активацией TLR4 рецепторов, которые, в свою очередь, изменяют экспрессию генов белков, стимулирующих миграцию и пролиферацию клеток меланомы (табл. 2) [79, 107]. В другом исследовании установлено, что LL-37, модулируя осуществляемую металлопротеиназами активацию EGFR, HER-2 рецепторов, опосредованно инициирует в клетках A375 и A875 меланомы запуск p38/MAPK, Ras/MAPK и NF-κB каскадов, усиливает экспрессию мРНК

Y-бох-связывающего белка-1 (YB-1) и другие процессы, определяющие пролиферацию, миграцию, инвазию и метастазирование опухолевых клеток [21, 55].

Плоскоклеточный рак кожи

При воздействии рекомбинантного LL-37 на клетки A431 плоскоклеточного рака кожи наблюдается повышение в этих клетках экспрессии мРНК ДНК-связывающего белка A (dbpA), усиливается их пролиферация и инвазия. Обработка A431 клеток пиролдиндитиокарбаматом (PDTС) — ингибитором фактора транскрипции NF-κB, угнетает экспрессию dbpA белка, свидетельствуя, что LL-37 опосредованная пролиферация запускается через NF-κB-сигнальный путь (табл. 2) [114, 115].

Механизмы действия LL-37 на клетки плоскоклеточного рака полости рта

По сравнению с нормальными клетками слизистой оболочки полости рта, в тканях плоскоклеточного рака полости рта показана низкая экспрессия гена *CAMP*, которая ассоциирована с метилированием ДНК в области промотора *CAMP* и коррелирует со слабой дифференцировкой, прогрессией опухоли и метастазированием ее клеток в лимфатические узлы [20]. Эти данные позволяют предполагать, что LL-37 может действовать в качестве опухолевого супрессора в клетках плоскоклеточного рака полости рта (табл. 1) [20]. В другом исследовании документировано, что при действии LL-37 стимулируется деполяризация мембран митохондрий и каспаза-3, каспаза-9 независимый апоптоз в клетках SAS-H1 плоскоклеточного рака полости рта, но не в фибробластах десны человека (HGF) и кератиноцитах HaCaT человека [84]. Авторы делают вывод, что LL-37 может быть использован в качестве противоопухолевого препарата у пациентов при лечении плоскоклеточного рака полости рта [84].

Механизмы действия LL-37 на клетки рака желудка

Секреция LL-37 повышается эпителиальными клетками и фундальными железами желудка при воспалении или инфекции *Helicobacter pylori*. Известно, что воспаление и инфекция *H. pylori* способствуют развитию рака желудка [8, 58, 118]. Было показано, что LL-37 в физиологических концентрациях при патологии оказывает противоопухолевый эффект, ассоциированный со снижением пролиферации клеток рака желудка, в которых его секреция существенно подавлена [23, 45]. Механизм такого действия LL-37 связан с активацией BMPRII рецепторов, в результате которой фосфорилируются Smad1, Smad5, Smad8 белки, причем Smad1, являясь транскрипционным фактором, регулирует экспрессию многих

генов, в том числе ингибитора циклинзависимой киназы p21Waf1, морфогенного белка кости (BMP4), циклина E2. Белок Smad1 убиквитинируется и подвергается протеолитическому расщеплению в протеасомах (табл. 1) в клетках рака желудка [117, 118]. В результате противоопухолевого действия LL-37 наблюдается приостановка G₀/G₁-фазы клеточного цикла посредством активации BMP4, Smad1, Smad4, Smad5, Smad8, p21Waf1/Cip1 факторов и ингибирования протеасомы, циклина E2, участвующих в регуляции клеточного цикла [13, 63]. Однако возможно, что в желудке LL-37 будет быстро терять активность вследствие расщепления протеазами.

Противоопухолевое действие LL-37 может осуществляться по другому механизму — через связывание с рецептором (FPR2) на малигнизированных клетках желудка, в результате чего наблюдается ингибирование ангиогенеза опухоли [88]. Если LL-37 связывается с этим же рецептором на моноцитах, нейтрофилах и первого типа CD4⁺T-лимфоцитах, то стимулируется их активация и хемотаксис (табл. 1) [121].

Экспрессия мРНК IL-32 в эпителиальных клетках AGS желудка повышена при гастрите и раке желудка, и оценка ее уровня может применяться как прогностический маркер у пациентов с раком желудка [86]. В последнее время обнаружено, что при действии LL-37 наблюдается уменьшение экспрессии гена *IL32* и его уровня в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК, PBMC), а также угнетается секреция провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6 клетками рака желудка [45]. Механизм такого подавления LL-37 экспрессии и секреции провоспалительных цитокинов реализуется через связывание с FPR2 рецептором и активацию p44/42 MAPK и MKP1 киназ, что в итоге снижает интенсивность процесса воспаления и препятствует росту опухоли желудка (табл. 1) [69].

Механизмы действия LL-37 и PG-1 на клетки рака поджелудочной железы

Уровни экспрессии и секреции LL-37 повышены в стволовых клетках аденокарциномы протоков поджелудочной железы, а также в строме и опухоли-ассоциированных макрофагах [96]. Установлена прямая корреляция между уровнем LL-37 и пролиферацией стволовых клеток аденокарциномы протоков поджелудочной железы (табл. 2) [96]. На генно-инженерной K-Ras+/LSL-G12D, Trp53LSLR172H модели опухолевого процесса у мышей, которым проводили трансплантацию клеток рака поджелудочной железы человека, показано, что при введении рекомбинантного LL-37 наблюдается усиление пролиферации клеток и рост опухоли, в то время как фармакологическое ингибирование рецеп-

торов, с которыми связывается LL-37, — FPR2 и P2X7 ассоциируется с угнетением развития опухоли [96]. Поэтому применение ингибиторов этих рецепторов, нацеленных на стволовые клетки опухоли, может быть перспективным подходом в терапии пациентов с раком поджелудочной железы [21].

Механизмы действия LL-37 и PG-1 на клетки колоректального рака

Показан высокий уровень экспрессии гена *CAMP* в нормальных клетках слизистой оболочки толстой кишки. Наоборот, в опухолевых клетках при колоректальном раке наблюдается сильное угнетение экспрессии гена *CAMP*. При этом низкий уровень экспрессии *CAMP* может рассматриваться в качестве биомаркера колоректального рака [93]. При снижении секреции LL-37 наблюдается усиление роста клеток колоректального рака, что может указывать на его противоопухолевый эффект [93]. В результате связывания LL-37 с трансмембранным доменом одного из G-белок связанных рецепторов, пока не установленного, уменьшается Bcl-2, пролиферация и запускается каскад реакций с участием апоптотических факторов Bax, Bak, Puma, p53 и эндонуклеазы G (EndoG) в клетках HCT116 колоректального рака (табл. 1) [11, 65, 92].

В другом исследовании при проведении иммуногистохимического окрашивания тканей опухолей, полученных в модели гетеротрансплантации клеток HT-29 колоректального рака человека nude мышам, установлено, что противоопухолевое действие LL-37 коррелирует с разрушением белка цитоскелета — тубулина в HT-29 клетках колоректального рака и CCD-18Co фибробластах кишечника [22].

Предполагается, что проапоптотическое действие LL-37 может реализоваться через еще один механизм: показано, что при применении пептида на клетках HCT116 колоректального рака наблюдается снижение экспрессии хемокинового CXCR4 рецептора 4 (CXCR4), Akt, повышение уровня белка p21 микроРНК miR-663a, приводящих к остановке G₂/M перехода в этих клетках (табл. 1) [64].

Интерес вызывает исследование Ren M. и соавт. (2013), в котором изучался противоопухолевый механизм действия фрагмента LL-37 — FK-16 в клетках HCT116 колоректального рака. Авторы обнаружили, что при действии FK-16 инициируется аутофагия клеток, происходящая в результате активации экспрессии генов аутофагальных белков LC3-I, LC3-II, Atg5 и Atg7 и LC3-позитивных аутофагосом, а также запускается процесс апоптоза через p53/Bcl-2/Bax сигнальный каскад, который не ингибируется WRW4 — антагонистом FPR2 рецептора. При этом в результате блоки-

рования аутофагии индуцируется апоптоз клеток и наоборот [92]. При действии LL-37 снижается пролиферация и индуцированная трансформированным фактором роста- β_1 экспрессия виментина и α -актина, запускающая эпителиально-мезенхимальный переход в клетках HT-29 [22]. В последние годы высказано предположение о витамин D₃-зависимом механизме действия LL-37 на клетки колоректального рака [21]. Основанием для этого послужили исследования, в которых установлено протекторное действие витамина D₃ и полиморфизмов его гена *VDR* в развитии колоректального рака, а также ассоциация дефицита витамина D с высоким риском рака [105, 125]. Известно, что витамин D₃ является эндогенным индуктором hCAP18, так как промотор гена *CAMP* включает последовательность, кодирующую витамин D₃ отвечающий элемент (vitamin D responsive element – VDRE) для рецептора витамина D₃ (VDR), вследствие чего VDR может рассматриваться, как транскрипционный фактор, регулирующий и экспрессию гена *CAMP*. На клетках линии HCT116 колоректальной карциномы установлены противоопухолевые *in vitro* и *in vivo* апоптогенные эффекты комбинации доцетаксела (Doc) с LL-37, инкапсулированных в биodeградируемые полимерные наночастицы. Эффективность применения *in vivo* комбинации была изучена при внутрибрюшинной гетеротрансплантации HCT116 клеток 6-8 недельным BALB/c nude мышам. Показано, что комбинация обладает сильным аддитивным антипролиферативным эффектом (комбинационный индекс CI > 1) на раковые клетки и пролонгирует выживаемость мышей (60 дней $p < 0,01$) по сравнению с обособленным действием химиопрепарата (45 дней) и LL-37 (49 дней). При действии комбинации Doc с LL-37 также наблюдается снижение ангиогенеза в тканях колоректальной карциномы. Однако с помощью МТТ-анализа было показано, что при обособленном применении LL-37 жизнеспособность HCT116 клеток снижается только в высоких дозах [35].

Механизмы действия LL-37 и PG-1 на клетки рака предстательной железы

Экспрессия гена *CAMP* и уровни LL-37 повышены *in vitro* и *in vivo* при раке предстательной железы по сравнению с нетрансформированными клетками железы и ассоциированы с клинической стадией заболевания и оценкой по шкале Глисона [106]. В результате действия LL-37 усиливается пролиферация и инвазия раковых клеток через активацию PI3K/Akt, Erk 1/2, Snail, E-кадгерин и MMP-3 сигнальных путей (табл. 2) [47, 91]. Исследования di Virgilio F. и соавт. показали, что в результате ингибирования рецептора, с которым связывается LL-37 – P2X7R,

наблюдается подавление миграции, инвазии и метастазирования клеток рака предстательной железы [30]. Следовательно, высказывается мнение об использовании LL-37 в качестве мишени для ингибирования антителами при проведении антиангиогенной терапии у пациентов с раком предстательной железы, устойчивых к препаратам против фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [60].

Механизмы действия LL-37 и PG-1 на клетки рака яичников

Кателицидин LL-37 оказывает противоопухолевый эффект в экспериментах на модели рака яичников *in vitro* [24]. В работе Roberto Lande и соавт. (2007) показано, что LL-37 связывается с ДНК или CpG-олигонуклеотидами (CpG-ODN), облегчает их перенос в плазматические дендритные клетки посредством эндоцитоза, где далее эти соединения активируют эндосомальные Toll-подобные рецепторы 9 (TLR9), инициируя тем самым каскады реакций, приводящие к продуцированию интерферона- α (IFN α) [67].

В исследовании, проведенном Chuang C.M. и соавт. (2009) на C57BL/6 мышах с опухолями яичников, показано, что при введении животным комбинации LL-37 (100 мкг/мышь) с CpG-ODN (30 мкг/мышь) наблюдается повышение эффективности доставки CpG-ODN в эндосомы, в результате усиливается экспрессия гена *IFNG* и активация CD1⁺NK1-клеток и F4/CD80⁺-макрофагов, ингибирующих рост раковых клеток (табл. 1). Таким образом, использование комбинации CpG-ODN с LL-37 пролонгирует выживаемость мышей в сравнении с обособленным применением CpG-ODN и LL-37 [24].

Помимо цитотоксического действия LL-37 демонстрирует и другие эффекты. Показано, что при обработке пептидом (5 μ g/mL) клеток HEY и SK-OV-3 рака яичников, повышается секреция этими клетками матриксных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9, стимулируется их пролиферация, миграция и инвазия [25]. Поэтому некоторые авторы считают, что оценка уровня LL-37 в крови может быть использована в качестве биомаркера при раке яичников. Механизм такого проонкогенного эффекта LL-37, как предполагается, связан с взаимодействием пептида с FPR2 рецептором, в результате которого происходит активация рецептора и запуск каскада реакций, начинающихся с фосфорилирования ERK-1/2 и идущих при участии белка, связывающего цАМФ-отвечающий элемент (CREB). Реализация этого сигнального каскада приводит к усилению рекрутирования мезенхимальных стромальных клеток, инвазии клеток рака яичников и его прогрессии (табл. 2) [26]. В свою очередь,

мезенхимальные стромальные стволовые клетки и опухоль-ассоциированные макрофаги секретируют провоспалительные цитокины: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 и TNF α , которые поддерживают рост клеток рака яичников [26]. При этом мезенхимальные стромальные стволовые клетки также секретируют IL-12, который оказывает иммуносупрессирующий эффект на NK-клетки и цитотоксические Т-лимфоциты, тем самым подавляя ответ организма на развивающуюся опухоль [19]. Показано, что версикан V1, экспрессируемый клетками рака яичника, усиливает в макрофагах экспрессию LL-37, которую стимулирует через TLR2 рецептор и витамин D₃-зависимую пролиферацию раковых клеток [71]. Как уже отмечалось выше, известно, что 1,25-дигидроксивитамин D₃ индуцирует экспрессию гена кателицидина *CAMP* (табл. 2) [106]. При этом полиморфизм rs1544410 (C > A,G,T, BsmI, c.1024+283G > AT) гена *VDR* является фактором риска развития рака яичников (AG vs GG, OR = 1,46; P = 0,031) в европейской популяции [90]. Данный полиморфизм rs1544410 (BsmI) и rs2228570 (FokI, A > C,G,T с 2, 152, p.Met1Arg) ассоциированы с развитием рака яичников в польской популяции (BsmI: Bb+BB vs bb OR = 1,648, p = 0,0221) и (FokI: ff vs Ff+FF OR = 1,542, p = 0,1123) [81].

Механизмы действия LL-37 и PG-1 на трансформированные лейкоциты и лимфоциты

Экспрессия гена *CAMP* существенно подавлена у пациентов с лейкозом. Ее снижение ассоциировано с прогрессированием заболевания [9, 87]. Установлено, что при действии LL-37 наблюдается каспазо-независимый апоптоз через повышение уровня внутриклеточного Ca²⁺, деполяризацию мембран митохондрий и активацию кальпаинов, Вах, AIF в опухолевой Jurkat Т-клеточной линии (табл. 1) [73]. До настоящего времени не обнаружено рецептора LL-37 в клетках Jurkat, но известно, что рецептор (FPR2), с которым пептид взаимодействует, экспрессируется в Т-лимфоцитах [120]. Также LL-37 синергически усиливает эффекты антибиотиков на клетки эритромиелоза K562 человека, при этом в результате совместного действия с доксорубицином возрастает доля клеток, гибнущих по типу некроза, а при сочетанном действии с гентамицином — по типу апоптоза [3, 4]. При секреции LL-37 воспалительными макрофагами M1 наблюдается деполяризация мембран митохондрий и стимуляция апоптоза в клетках лимфомы Беркитта [14].

С другой стороны, снижение продукции LL-37, например, опухоль-ассоциированными M2 макрофагами (TAM), через витамин D₃-сигнальный путь стимулирует рост клеток лимфомы Беркитта [14]. Этот эффект LL-37 подтверждается и на

генно-инженерной модели на мышах, нокаутированных по гену *-/-CAMP* при гетеротрансплантации клеток RMA-S Т-клеточной лимфомы. У таких мышей, наблюдались дефектные NK-клетки, обладающие сниженной цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам [15].

Что касается PG-1, то он оказывает синергическое цитотоксическое действие в комбинациях с доксорубицином, актиномицином D или полимиксином В на клетки эритромиелоза K562 человека, в которых индуцируется как некроз, так и апоптоз [3, 4]. При действии PG-1 также наблюдается инициация апоптоза в клетках лимфомы, однако предположений о механизме этого эффекта авторы пока не сделали [104].

Механизмы действия LL-37 и PG-1 на клетки глиомы и нейробластомы

В экспериментах *in vitro* показано, что при одностороннем действии LL-37 и его С-фрагмента LL₁₇₋₃₂ дозо-зависимым образом (0-50 мкМ, минимальная ингибирующая концентрация МИК₉₀ 12,5 и 6,25 мкМ соответственно) наблюдается подавление жизнеспособности клеток глиобластомы U87G человека и клеток штамма *Streptococcus agalactiae* NEM 316 [27]. Установлено, что цитотоксическое действие рекомбинантного PG-1 на клетки SH-SY5Y нейробластомы (GrIV) коррелирует с содержанием анионных сульфатированных протеогликанов в мембранах опухолевых клеток [103]. Интересно отметить, что мембраны нейробластомы SH-SY5Y имеют более высокий отрицательный заряд, чем в клетках опухолей низкой степени злокачественности, что, по мнению Soundrarajan и соавт., может быть, отчасти, связано с облегченным транспортом катионов K⁺ и Ca²⁺ в клетки нейробластомы, который приводит к изменению трансмембранного потенциала [103]. Эти факты частично объясняют селективное противоопухолевое действие PG-1 в отношении клеток нейробластомы по сравнению с клетками не нейронального происхождения (фибробласты NIH-3T3 и HEK293T). Однако молекулярные механизмы действия PG-1 и LL-37 на клетки опухолей мозга остаются до сих пор не изученными, что свидетельствует об актуальности проведения дальнейших исследований в этом направлении.

Заключение

Кателицидин LL-37 проявляет тканеспецифическое действие в отношении клеток различных типов опухолей. Механизмы такого действия LL-37 включают взаимодействие с FPR2, CXCR2, P2Y11, P2X7, MrgX2, EGFR/Erbb1, Erbb2, IGF1R, LGIC и TLR рецепторами (в большинстве случаев обусловленное связыванием пептида

с трансмембранным участком рецептора, приводящее к изменению конформации рецепторных белков и модуляции их активности), экспрессия которых значительно изменяется в разных типах опухолей по сравнению с нормой. Например, повышение экспрессии гена *CAMP* и уровня секреции LL-37 ассоциированы с прогрессированием аденокарциномы легкого, рака молочной, поджелудочной и предстательной желез, яичников, меланомы и плоскоклеточного рака кожи. Напротив, экспрессия *CAMP* и уровень секреции LL-37 существенно снижены в клетках рака желудка, плоскоклеточного рака полости рта, колоректального рака, лейкозах, лимфомах, глиомах и SH-SY5Y нейробластоме.

Кроме того, экспрессия гена *CAMP* в большинстве типов опухолевых клеток индуцибельна, например, при действии витамина D₃. Это делает актуальными дальнейшие исследования для изучения ассоциаций факторов, модулирующих (индуцирующих и ингибирующих) экспрессию *CAMP*, с развитием опухоли. К настоящему времени в литературе широко обсуждаются перспективы практического применения LL-37 и его производных в качестве средств борьбы со злокачественными новообразованиями, разработаны и запатентованы структуры различных аналогов этого пептида, обладающих противоопухолевым действием. Однако при этом особенно важно учитывать, что терапевтические эффекты LL-37 и его производных могут использоваться только для конкретных типов опухолей. Очевидно, что нецелесообразно применение пептида в случае тех новообразований, для которых в литературе описано возможное проонкогенное действие, в том числе, когда LL-37 способствует развитию воспалительного или аутоиммунного процессов. В таких случаях, напротив, вероятно, более эффективно следует применять антитела или какие-либо анионные молекулы, чтобы снизить отрицательные эффекты пептида.

Механизмы действия PG-1 на опухолевые клетки остаются еще плохо изученными, хотя имеющиеся данные свидетельствуют, что протегрин проявляет более однонаправленное дей-

ствие — повреждает мембраны. Установлено, что PG-1 оказывает цитотоксическое действие на опухолевые клетки человека (клетки карциномы молочной железы MCF-7, эритромиелоз К562, гистиоцитарной лимфомы U-937, эпителиоидной карциномы легкого A-549, эпидермоидной карциномы A-431, остеосаркомы MG-63 и другие клетки, включая устойчивые к доксорубину). При этом следует отметить, что PG-1 и LL-37 синергически усиливают противоопухолевые эффекты химиопрепаратов и, повреждая мембраны клеток и/или проникая во внутриклеточное пространство, оказывают более выраженное действие на опухолевые, чем на нормальные клетки. При условии повышения селективности действия PG-1 в отношении малигнизированных клеток, этот пептид может рассматриваться, как более перспективный препарат для комбинированной терапии, чем LL-37. Для повышения избирательности действия PG-1 в отношении опухолевых клеток могут использоваться различные подходы, включая разработку новых структурных аналогов пептида с оптимизированными свойствами, создание химерных молекул, включающих последовательность протегрина и участки, избирательно связывающиеся с маркерными молекулами на поверхности опухолевых клеток.

Таким образом, природные пептиды врожденного иммунитета представляются перспективными кандидатами на роль новых противоопухолевых средств, которые проявляют активность и в отношении злокачественных метастазирующих, рецидивирующих опухолей с множественной лекарственной устойчивостью. С другой стороны, такие пептиды, как LL-37, проявляют в некоторых случаях и свойства, которые могут рассматриваться как проонкогенные, что указывает на необходимость дальнейшего детального изучения молекулярных механизмов их действия на опухолевые клетки, а также тщательное рассмотрение эффектов пептидов на каждый тип опухоли на моделях *in vitro* и *in vivo*, в том числе и анализ роли полиморфизма гена кателицидина в реализации этих эффектов.

Список литературы / References

1. Абатуров А.Е., Никулина А.А. Развитие иммунного ответа при стафилококковой пневмонии (часть 4) // Здоровье ребенка, 2017. № 12. С. 648-656. [Abaturov A.E., Nikulina A.A. Development of the immune response in staphylococcal pneumonia (part 4). *Zdorovye rebenka = Child Health*, 2017, no. 12, pp. 648-656. (In Russ.)]
2. Баландин С.В., Емельянова А.А., Калашникова М.Б., Кокряков В.Н., Шамова О.В., Овчинникова Т.В. Молекулярные механизмы противоопухолевого действия природных антимикробных пептидов // Биоорганическая химия, 2016. Т. 42, № 6. С. 633-648. [Balandin S.V., Emelyanova A.A., Kalashnikova M.B., Kokryakov V.N., Shamova O.V., Ovchinnikova T.V. Molecular mechanisms of the antitumor action of natural antimicrobial peptides. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry*, 2016, Vol. 42, no. 6, pp. 633-648. (In Russ.)].

3. Жаркова М.С. Сочетанное действие белков и пептидов системы врожденного иммунитета и соединений различной химической природы в реализации их антибиотических свойств: автореф. ... канд. биол. наук. СПб.: Институт экспериментальной медицины, 2016. 23 с. [Zharkova M.S. The combined effect of proteins and peptides of the innate immunity system and compounds of various chemical nature in the implementation of their antibiotic properties. Abstract of PhD thesis]. St. Petersburg: Institute of Experimental Medicine, 2016. 23 p.
4. Жаркова М.С., Артамонов А.Ю., Гринчук Т.М., Буцкина Е.А., Пазина Т.Ю., Орлов Д.С., Шамова О.В. Пептиды системы врожденного иммунитета модулируют цитотоксическое действие противоопухолевых антибиотиков // Российский иммунологический журнал, 2016. Т. 10, № 2. С. 548-550. [Zharkova M.S., Artamonov A.Yu., Grinchuk T.M., Butskina E.A., Pazina T.Yu., Orlov D.S., Shamova O.V. Peptides of the innate immune system modulate the cytotoxic effect of antitumor antibiotics. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2016, Vol. 10, no. 2, pp. 548-550. (In Russ.)]
5. Шамова О.В., Орлов Д.С., Пазина Т.Ю., Ямщикова Е.В., Орлов С.Б., Жаркова М.С., Гринчук Т.М., Арцыбашева И.В., Юхнев В.А., Кокряков В.Н. Изучение молекулярно-клеточных основ цитотоксического действия антимикробных пептидов на опухолевые клетки // Фундаментальные исследования, 2012. № 5, Ч. 1. С. 207-212. [Shamova O.V., Orlov D.S., Pazina T.Yu., Yamshchikova E.V., Orlov S.B., Zharkova M.S., Grinchuk T.M., Artsybasheva I.V., Yukhnev V.A., Kokryakov V.N. Study of the molecular and cellular bases of the cytotoxic effect of antimicrobial peptides on tumor cells. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2012, no. 5, Pt 1, pp. 207-212. (In Russ.)]
6. Шамова О.В., Сакута Г.А., Орлов Д.С., Зенин В.В., Штейн Г.И., Колодкин Н.И., Афонина И.Н., Кокряков В.Н. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре // Цитология, 2007. Т. 49, № 12. С. 1000-1010. [Shamova O.V., Sakuta G.A., Orlov D.S., Zenin V.V., Stein G.I., Kolodkin N.I., Afonina I.N., Kokryakov V.N. The effect of antimicrobial peptides from neutrophilic granulocytes on tumor and normal cells in culture. *Tsitologiya = Cytologiya*, 2007, Vol. 49, no. 12, pp. 1000-1010. (In Russ.)]
7. Agerberth B., Charo J., Werr J., Olsson B., Idali F., Lindbom L., Kiessling R., Jörnvall H., Wigzell H., Gudmundsson G.H. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 2000, Vol. 96, no. 9, pp. 3086-3093.
8. Alzahrani S., Lina T.T., Gonzalez J., Pinchuk I.V., Beswick E.J., Reyes V.E. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, pp. 12767-12780.
9. An L.L., Yang Y.H., Ma X.T., Lin Y.M., Li G., Song Y.H., Wu K.F. LL-37 enhances adaptive antitumor immune response in a murine model when genetically fused with M-CSFR (J6-1) DNA vaccine. *Leuk. Res.*, 2005, Vol. 29, no. 5, pp. 535-543.
10. Armogida S.A., Yannaras N.M., Melton A.L., Srivastava M.D. Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk. *Allergy Asthma Proc.*, 2004, Vol. 25, no. 5, pp. 297-304.
11. Arnoult D., Gaume B., Karbowski M., Sharpe J.C., Cecconi F., Youle R.J. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO*, 2003, Vol. 22, no. 17, pp. 4385-4399.
12. Bals R., Wang X., Zasloff M., Wilson J.M. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1998, Vol. 95, no. 16, pp. 9541-9546.
13. Bartek J., Lukas J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett.*, 2001, Vol. 490, no. 3, pp. 117-122.
14. Bruns H., Büttner M., Fabri M., Mougiakakos D., Bittenbring J.T., Hoffmann M.H., Beier F., Pasemann S., Jitschin R., Hofmann A.D., Neumann F., Daniel C., Maurberger A., Kempkes B., Amann K., Mackensen A., Gerbitz A. Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci. Transl. Med.*, 2015, Vol. 7, no. 282, 282ra47. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa3230.
15. Büchau A.S., Morizane S., Trowbridge J., Schaubert J., Kotol P., Bui J.D., Gallo R.L. The host defense peptide cathelicidin is required for NK cell-mediated suppression of tumor growth. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 1, pp. 369-378.
16. Campaner S., Doni M., Hydbring P., Verrecchia A., Bianchi L., Sardella D., Schleker T., Perna D., Tronnersjo S., Murga M., Fernandez Capetillo O., Barbacid M., Larsson L.G., Amati B. Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the c-myc oncogene. *Nat. Cell Biol.*, 2010, Vol. 12, no. 1, pp. 54-59.
17. Can G., Akpinar B., Baran Y., Zhivotovsky B., Olsson M. 5-Fluorouracil signaling through a calcium-calmodulin-dependent pathway is required for p53 activation and apoptosis in colon carcinoma cells. *Oncogene*, 2013, Vol. 32, no. 38, pp. 4529-4538.
18. Carmona F.J., Montemurro F., Kannan S., Rossi V., Verma C., Baselga J., Scaltriti M. AKT signaling in ERBB2-amplified breast cancer. *Pharmacol. Ther.*, 2016, Vol. 158, pp. 63-70.
19. Chen P.M., Yen M.L., Liu K.J., Sytwu H.K., Yen B.L. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci.*, 2011, Vol. 18, no. 1, 49. doi: 10.1186/1423-0127-18-49.
20. Chen X., Qi G., Qin M., Zou Y., Zhong K., Tang Y., Guo Y., Jiang X., Liang L., Zou X. DNA methylation directly downregulates human cathelicidin antimicrobial peptide gene (CAMP) promoter activity. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 17, pp. 27943-27952.

21. Chen X., Zou X., Qi G., Tang Y., Guo Y., Si J., Liang L. Roles and mechanisms of human cathelicidin LL-37 in cancer. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2018, Vol. 47, no. 3, pp. 1060-1073.
22. Cheng M., Ho S., Yoo J.H., Tran D. H.-Y., Bakirtzi K., Su B., Tran D. H.-N., Kubota Y., Ichikawa R., Koon H.W. Cathelicidin suppresses colon cancer development by inhibition of cancer associated fibroblasts. *Clin. Exp. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 8, pp. 13-29.
23. Choi K.Y., Napper S., Mookherjee N. Human cathelicidin LL-37 and its derivative IG-19 regulate interleukin-32-induced inflammation. *Immunology*, 2014, Vol. 143, no.1, pp. 68-80.
24. Chuang C.M., Monie A., Wu A., Mao C-P, Hung C-F. Treatment with LL-37 peptide enhances antitumor effects induced by CpG oligodeoxynucleotides against ovarian cancer. *Hum. Gene Ther.*, 2009, Vol. 20, no. 4, pp. 303-313.
25. Coffelt S.B., Waterman R.S., Florez L., Höner zu Bentrup K., Zwezdaryk K.J., Tomchuck S.L., LaMarca H.L., Danka E.S., Morris C.A., Scandurro A.B. Ovarian cancers overexpress the antimicrobial protein hCAP-18 and its derivative LL-37 increases ovarian cancer cell proliferation and invasion. *Int. J. Cancer*, 2008, Vol. 122, no. 5, pp. 1030-1039.
26. Coffelt S.B., Marini F.C., Watson K., Zwezdaryk K.J., Dembinski J.L., LaMarca H.L., Tomchuck S.L., Honer zu Bentrup K., Danka E.S., Henkle S.L., Scandurro A.B. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 10, pp. 3806-3811.
27. Colle J.-H., Périchon B., Garcia A. Antitumor and antibacterial properties of virally encoded cationic sequences. *Biologics*, 2019, Vol. 13, pp. 117-126.
28. Dennison S.R., Whittaker M., Harris F., Phoenix D.A. Anticancer alpha-helical peptides and structure/function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2006, Vol. 7, no. 6, pp. 487-499.
29. Deslouches B., Di P.Y. Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 28, pp. 46635-46651.
30. di Virgilio F., Falzoni S., Giuliani A.L., Adinolfi E. P2 receptors in cancer progression and metastatic spreading. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2016, Vol. 29, pp. 17-25.
31. Do N., Weindl G., Grohmann L., Salwiczek M., Kokscho B., Korting H.C., Schäfer-Korting M. Cationic membrane-active peptides – anticancer and antifungal activity as well as penetration into human skin. *Exp. Dermatol.*, 2014, Vol. 23, no. 5, pp. 326-331.
32. Dobrzyńska I., Szachowicz-Petelska B., Sulkowski S., Figaszewski Z. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 2005, Vol. 276, no. 1-2, pp. 113-119.
33. Drin G., Cottin S., Blanc E., Rees A.R., Temsamani J. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, no. 33, pp. 31192-31201.
34. Dube D.H., Bertozzi C.R. Glycans in cancer and inflammation – potential for therapeutics and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, Vol. 4, no. 6, pp. 477-488.
35. Fan R., Tong A., Li X., Gao X., Mei L., Zhou L., Zhang X., You C., Guo G. Enhanced antitumor effects by docetaxel/LL37-loaded thermosensitive hydrogel nanoparticles in peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Intern. J. Nanomedicine*, 2015, Vol. 10, pp. 7291-7305.
36. Farabaugh S.M., Chan B.T., Cui X., Dearth R.K., Lee A.V. Lack of interaction between ErbB2 and insulin receptor substrate signaling in breast cancer. *Cell Commun. Signal.*, 2016, Vol. 14, 25. doi: 10.1186/s12964-016-0148-8.
37. Ferrari D., Pizzirani C., Adinolfi E., Lemoli R.M., Curti A., Idzko M., Panther E., di Virgilio F. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 7, pp. 3877-3883.
38. Findlay E.G., Currie A.J., Zhang A., Ovcariakova J., Young L., Stevens H., McHugh B.J., Canel M., Gray M., Milling S.W.F., Campbell J.D.M., Savill J., Serrels A., Davidson D.J. Exposure to the antimicrobial peptide LL-37 produces dendritic cells optimized for immunotherapy. *Oncoimmunology*, 2019, Vol. 8, no. 8, 1608106. doi: 10.1080/2162402X.2019.1608106.
39. Frohm M., Agerberth B., Ahangari G., Stähle-Bäckdahl M., Lidén S., Wigzell H., Gudmundsson G.H. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.*, 1997, no. 24, Vol. 272, pp. 15258-15263.
40. Gambade A., Zreika S., Guéguinou M., Chourpa I., Fromont G., Bouchet AM., Burlaud-Gaillard J., Potier-Cartreau M., Roger S., Aucagne V., Chevalier S., Vandier C., Goupille C., Weber G. Activation of TRPV2 and channels by the LL-37 enantiomers stimulates calcium entry and migration of cancer cells. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 17, pp. 23785-23800.
41. Gao P., Zhao H., You J., Jing F., Hu Y. Association between interleukin-8 -251A/T polymorphism and risk of lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Invest.*, 2014, Vol. 32, pp. 518-525.
42. Girnita A., Zheng H., Grönberg A., Girnita L., Stähle M. Identification of the cathelicidin peptide LL-37 as agonist for the type I insulin-like growth factor receptor. *Oncogene*, 2012, Vol. 31, pp. 352-365.
43. Gombart A.F., Borregaard N., Koeffler H.P. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB J.*, 2005, Vol. 19, no. 9, pp. 1067-1077.

44. Gupta K., Kotian A., Subramanian H., Daniell H., Ali H. Activation of human mast cells by retrocyclin and protegrin highlight their immunomodulatory and antimicrobial properties. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, no. 30, pp. 28573-28587.
45. Hase K., Murakami M., Iimura M., Cole SP., Horibe Y., Ohtake T., Obonyo M., Gallo R.L., Eckmann L., Kagnoff M.F. Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 2003, Vol. 125, no. 6, pp. 1613-1625.
46. Heilborn J.D., Nilsson M.F., Jimenez C.I., Sandstedt B., Borregaard N., Tham E., Sørensen O.E., Weber G., Ståhle M. Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. *Int. J. Cancer*, 2005, Vol. 114, no. 5, pp. 713-719.
47. Hensel J.A., Chanda D., Kumar S., Sawant A., Grizzle W.E., Siegal G.P., Ponnazhagan S. LL-37 as a therapeutic target for late stage prostate cancer. *Prostate*, 2011, Vol. 71, no. 6, pp. 659-670.
48. Henzler-Wildman K.A., Lee D.K., Ramamoorthy A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry*, 2003, Vol. 42, no. 21, pp. 6545-6558.
49. Hoskin D.W., Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, Vol. 1778, no. 2, pp. 357-375.
50. International agency for research of cancer (Globocan) [Electronic resource]: the World of Health Organization, 2018. Mode of access: <http://www.globocan.iarc.fr>. Data of access: 23.05.2020.
51. Iozzo R.V., Sanderson R.D. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J. Cell Mol Med.*, 2011, Vol. 15, no. 5, pp. 1013-1031.
52. Ishitsuka Y., Pham D.S., Waring A.J., Lehrer R.I., Lee K.Y. Insertion selectivity of antimicrobial peptide protegrin-1 into lipid monolayers: effect of head group electrostatics and tail group packing. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, Vol. 1758, no. 9, pp. 1450-1460.
53. Jana J., Kar R.K., Ghosh A., Biswas A., Ghosh S., Bhunia A., Chatterjee S. Human cathelicidin peptide LL37 binds telomeric G-quadruplex. *Mol. Biosyst.*, 2013, Vol. 9, pp. 1833-1836.
54. Ji P., Zhou Y., Yang Y., Wu J., Zhou H., Quan W., Sun J., Yao Y., Shang A., Gu C., Zeng B., Firman J., Xiao W., Bals R., Sun Z., Li D. Myeloid cell-derived LL-37 promotes lung cancer growth by activating Wnt/ β -catenin signaling. *Theranostics*, 2019, Vol. 9, no. 8, pp. 2209-2223.
55. Jia J., Zheng Y., Wang W., Shao Y., Li Z., Wang Q., Wang Y., Yan H. Antimicrobial peptide LL-37 promotes YB-1 expression, and the viability, migration and invasion of malignant melanoma cells. *Mol. Med. Rep.*, 2017, Vol. 15, no. 1, pp. 240-248.
56. Johansson J., Gudmundsson G.H., Rottenberg M.E., Berndt K.D., Agerberth B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, no. 6, pp. 3718-3724.
57. Khandwala H.M., McCutcheon I.E., Flyvbjerg A., Friend K.E. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr. Rev.*, 2000, Vol. 21, no. 3, pp. 215-244.
58. Kim H.J., Hwang S.W., Kim N., Yoon H., Shin C.M., Park Y.S., Lee D.H., Park D.J., Kim H.H., Kim J.S., Jung H.C., Lee H.S. *Helicobacter pylori* and molecular markers as prognostic indicators for gastric cancer in Korea. *J. Cancer Prev.*, 2014, Vol. 19, no. 1, pp. 56-67.
59. Kim J.E., Kim H.J., Choi J.M., Lee K.H., Kim T.Y., Cho B.K., Jung J.Y., Chung K.Y., Cho D., Park H.J. The antimicrobial peptide human cationic antimicrobial protein-18/cathelicidin LL-37 as a putative growth factor for malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.*, 2010, Vol. 163, no. 5, pp. 959-967.
60. Koczulla R., von Degenfeld G., Kupatt C., Krötz F., Zahler S., Gloe T., Issbrücker K., Unterberger P., Zaiou M., Leberer C., Karl A., Raake P., Pfosser A., Boekstegers P., Welsch U., Hiemstra P.S., Vogelmeier C., Gallo R.L., Clauss M., Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.*, 2003, Vol. 111, no. 11, pp. 1665-1672.
61. Koensgen D., Bruennert D., Ungureanu S., Sofroni D., Braicu E.I., Sehouli J., Sümnick A., Delogu S., Zygmunt M., Goyal P., Evert M., Olek S., Biebler K.E., Mustea A. Polymorphism of the IL-8 gene and the risk of ovarian cancer. *Cytokine*, 2015, Vol. 71, no. 2, pp. 334-338.
62. Kokryakov V.N., Harwig S.S.L., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.M., Shamova O.V., Korneva H.A., Lehrer R.I. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.*, 1993, Vol. 327, no. 2, pp. 231-236.
63. Krętowski R., Stypułkowska A., Cechowska-Pasko M. Efficient apoptosis and necrosis induction by proteasome inhibitor: bortezomib in the DLD-1 human colon cancer cell line. *Mol. Cell. Biochem.*, 2015, Vol. 398, no. 1-2, pp. 165-173.
64. Kuroda K., Fukuda T., Krstic-Demonacos M., Demonacos C., Okumura K., Isogai H., Hayashi M., Saito K., Isogai E. miR-663a regulates growth of colon cancer cells, after administration of antimicrobial peptides, by targeting CXCR4-p21 pathway. *BMC Cancer*, 2017, Vol. 17, no. 1, 33. doi: 10.1186/s12885-016-3003-9.
65. Kuroda K., Fukuda T., Yoneyama H., Katayama M., Isogai H., Okumura K., Isogai E. Anti-proliferative effect of an analogue of the LL-37 peptide in the colon cancer derived cell line HCT116 p53+/+ and p53-/. *Oncol. Rep.*, 2012, Vol. 28, no. 3, pp. 829-834.
66. Kuroda K., Okumura K., Isogai H., Isogai E. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 and mimics are potential anticancer drugs. *Front Oncol.*, 2015, Vol. 5, 144. doi: 10.3389/fonc.2015.00144.

67. Lande R., Gregorio J., Facchinetti V., Chatterjee B., Wang Y.H., Homey B., Cao W., Wang Y.H., Su B., Nestle F.O., Zal T., Mellman I., Schröder J.-M., Liu Y.-J., Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 2007, Vol. 449, pp. 564-569.
68. Lau Y.E., Rozek A., Scott M.G., Goosney D.L., Davidson D.J., Hancock R.E.W. Interaction and cellular localization of the human host defense peptide LL-37 with lung epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2005, Vol. 73, no. 1, pp. 583-591.
69. Lee H.Y., Kim S.D., Shim J.W., Lee S.Y., Yun, J., Bae Y.S. LL-37 inhibits serum amyloid A-induced IL-8 production in human neutrophils. *Exp. Mol. Med.*, 2009, Vol. 41, pp. 325-333.
70. Leifer C.A., Medvedev A.E. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *J. Leukoc. Biol.*, 2016, Vol. 100, no. 5, pp. 927-941.
71. Li D., Wang X., Wu J.L., Quan W.Q., Ma L., Yang F., Wu K.Y., Wan H.Y. Tumor-produced versican V1 enhances hCAP18/LL-37 expression in macrophages through activation of TLR2 and vitamin D3 signaling to promote ovarian cancer progression *in vitro*. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 2, e56616. doi: 10.1371/journal.pone.0056616.
72. Lohner K., Blondelle S.E. Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2005, Vol. 8, no. 3, pp. 241-256.
73. Mader J.S., Mookherjee N., Hancock R.E., Bleackley R.C. The human host defense peptide LL-37 induces apoptosis in a calpain- and apoptosis-inducing factor-dependent manner involving Bax activity. *Mol. Cancer Res.*, 2009, Vol. 7, no. 5, pp. 689-702.
74. Maga G., Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.*, 2003, Vol. 116, Pt 15, pp. 3051-3060.
75. Mangoni M.E., Aumelas A., Charnet P., Roumestand C., Chiche L., Despaux E., Grassy G., Calas B., Chavanieu A. Change in membrane permeability induced by protegrin 1: implication of disulfide bridges for pore formation. *FEBS Lett.*, 1996, Vol. 383, no. 1-2, pp. 93-98.
76. Menssen A., Epanchintsev A., Lodygin D., Rezaei N., Jung P., Verdoodt B., Diebold J., Hermeking H. c-MYC delays prometaphase by direct transactivation of MAD2 and Bub R1: identification of mechanisms underlying c-MYC-induced DNA damage and chromosomal instability. *Cell Cycle*, 2007, Vol. 6, no. 3, pp. 339-352.
77. Miller K.D., Nogueira L., Mariotto A.B., Rowland J.H., Yabroff K.R., Alfano C.M., Jemal A., Kramer L., Siegel R.L. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.*, 2019, Vol. 69, no. 5, pp. 363-385.
78. Montreekachon P., Chotjumlong P., Bolscher J.G. Nazmi K., Reutrakul V., Krisanaprakornkit S. Involvement of P2X(7) purinergic receptor and MEK1/2 in interleukin-8 up-regulation by LL-37 in human gingival fibroblasts. *J. Periodontal Res.*, 2011, Vol. 46, no. 3, pp. 327-337.
79. Mookherjee N., Brown K.L., Bowdish D.M., Doria S., Falsafi R., Hokamp K., Roche F.M., Mu R., Doho G.H., Pistolic J., Powers J.P., Bryan J., Brinkman F.S., Hancock R.E. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 4, pp. 2455-2464.
80. Moon J.Y., Henzler-Wildman K.A., Ramamoorthy A. Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli*. *BBA-Biomembranes*, 2006, Vol. 1758, no. 9, pp. 1351-1358.
81. Mostowska A., Sajdak S., Pawlik P., Lianeri M., Jagodzinski P.P. Vitamin D receptor gene BsmI and FokI polymorphisms in relation to ovarian cancer risk in the Polish population. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*, 2013, Vol. 17, no. 3, pp. 183-187.
82. Neto G.T.C., de Lima T.M., Barbeiro H.V., Chammas R.M. Cathelicidin LL-37 Promotes or inhibits cancer cell stemness depending on the tumor origin. *Oncomedicine*, 2016, Vol. 1, pp. 14-17.
83. Nilsson M.F., Sandstedt B., Sørensen O., Weber G., Borregaard N., Ståhle-Bäckdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and co-localizes with interleukin-6. *Infect. Immun.*, 1999, Vol. 67, no. 5, pp. 2561-2566.
84. Okumura K., Itoh A., Isogai E., Hirose K., Hosokawa Y., Abiko Y., Shibata T., Hirata M., Isogai H. C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Lett.*, 2004, Vol. 212, no. 2, pp. 185-194.
85. Oren Z., Lerman J.C., Gudmundsson G.H., Agerberth B., Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-selective activity. *Biochem J.*, 1999, Vol. 341, Pt 3, pp. 501-513.
86. Peng L.S., Zhuang Y., Li W.H., Zhou Y.-Y., Wang T.-T., Chen N., Cheng P., Li B.-S., Guo H., Yang S.-M., Chen W.-S., Zou Q.-M. Elevated interleukin-32 expression is associated with *Helicobacter pylori*-related gastritis. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 3, e88270. doi: 10.1371/journal.pone.0088270.
87. Piktel E., Niemirowicz K., Wnorowska U., Wątek M., Wollny T., Głuszek K., Gózdź S., Levental I., Bucki R. The role of cathelicidin LL-37 in cancer development. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2016, Vol. 64, pp. 33-46.
88. Prevete N., Liotti F., Visciano C., Marone G., Melillo R.M., de Paulis A. The formyl peptide receptor 1 exerts a tumor suppressor function in human gastric cancer by inhibiting angiogenesis. *Oncogene*, 2015, Vol. 34, no. 29, pp. 3826-3838.
89. Pushpanathan M., Gunasekaran P., Rajendhran J. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. *Intern. J. Peptides*, 2013, Vol. 2013, 675391. doi: 10.1155/2013/675391.

90. Qin X., Lu Y., Qin A., Chen Z., Peng Q., Deng Y., Xie L., Wang J., Li R., Zeng J., Li S., Zhao J. Vitamin D receptor BsmI polymorphism and ovarian cancer risk: a meta-analysis. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2013, Vol. 23, no. 7, pp. 1178-1183.
91. Qiu Y., Li W.H., Zhang H.Q., Liu Y., Tian X.X., Fang W.G. P2X7 mediates ATP-driven invasiveness in prostate cancer cells. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 12, e114371. doi: 10.1371/journal.pone.0114371.
92. Ren S.X., Cheng A.S., To K.F., Tong J.H., Li M.S., Shen J., Wong C.C., Zhang L., Chan R.L., Wang X.J., Ng S.S., Chiu L.C., Marquez V.E., Gallo R.L., Chan F.K., Yu J., Sung J.J., Wu W.K., Cho C.H. Host immune defense peptide LL-37 activates caspase-independent apoptosis and suppresses colon cancer. *Cancer Res.*, 2012, Vol. 72, no. 24, pp. 6512-6523.
93. Ren S.X., Shen J., Cheng A.S., Lu L., Chan R.L., Li Z.J., Wang X.J., Wong C.C., Zhang L., Ng S.S., Chan F.L., Chan F.K., Yu J., Sung J.J., Wu W.K., Cho C.H. FK-16 derived from the anticancer peptide LL-37 induces caspase-independent apoptosis and autophagic cell death in colon cancer cells. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 5, e63641. doi: 10.1371/journal.pone.0063641.
94. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, Vol. 414, no. 6859, pp. 105-111.
95. Rothan H.A., Mohamed Z., Sasikumar P.G., Reddy K.A., Rahman N.A., Yusof R. In Vitro Characterization of Novel Protegrin-1 Analogues Against Neoplastic Cells. *Intern. J. Peptide Res. Ther.*, 2014, Vol. 20, no. 3, pp. 259-267.
96. Sainz B.Jr., Alcala S., Garcia E., Sanchez-Ripoll Y., Azevedo M.M., Cioffi M., Tatari M., Miranda-Lorenzo I., Hidalgo M., Gomez-Lopez G., Cañamero M., Erkan M., Kleeff J., García-Silva S., Sancho P., Hermann P.C., Heeschen C. Microenvironmental hCAP-18/LL-37 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma by activating its cancer stem cell compartment. *Gut*, 2015, Vol. 64, no. 12, pp. 1921-1935.
97. Schweizer F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *Eur. J. Pharmacol.*, 2009, Vol. 625, no. 1-3, pp. 190-194.
98. Shaykhiev R., Beisswenger C., Kändler K., Senske J., Püchner A., Damm T., Behr J., Bals R. Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2005, Vol. 289, pp. L842-L848.
99. Simons K., Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science*, 2000, Vol. 290, no. 5497, pp. 1721-1726.
100. Sørensen O., Arnljots K., Cowland J.B., Bainton D.F., Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood*, 1997, Vol. 90, no. 7, pp. 2796-2803.
101. Sørensen O.E., Gram L., Johnsen A.H., Andersson E., Bangsbo S., Tjabringa G.S., Hiemstra P.S., Malm J., Egesten A., Borregaard N. Processing of seminal plasma hCAP-18 to ALL-38 by gastricsin: a novel mechanism of generating antimicrobial peptides in vagina. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, no. 31, pp. 28540-28546.
102. Sorrentino C., di Carlo E. Expression of IL-32 in human lung cancer is related to the histotype and metastatic phenotype. *Am J. Respir. Crit. Care Med.*, 2009, Vol. 180, no. 8, pp. 769-779.
103. Soundararajan N., Park S., Quy L.V.C., Cho H-S., Raghunathan G., Ahn B., Song H., Kim J-H., Park C. Protegrin-1 cytotoxicity towards mammalian cells positively correlates with the magnitude of conformational changes of the unfolded form upon cell interaction. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, 11569. doi: 10.1038/s41598-019-47955-2.
104. Sugawara K., Shinohara H., Kadoya T., Kuramitz H. Sensing lymphoma cells based on a cell-penetrating/apoptosis-inducing/electron-transfer peptide probe. *Anal. Chim. Acta*, 2016, Vol. 924, pp. 106-113.
105. Sun J. The Role of Vitamin D and Vitamin D receptors in colon cancer. *Clin. Transl. Gastroenterol.*, 2017, Vol. 8, no. 6, e103. doi: 10.1038/ctg.2017.31.
106. Suzuki K., Murakami T., Hu Z., Tamura H., Kuwahara-Arai K., Iba T., Nagaoka I. Human host defense cathelicidin peptide ll-37 enhances the lipopolysaccharide uptake by liver sinusoidal endothelial cells without cell activation. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 3, pp. 1338-1347.
107. Takazawa Y., Kiniwa Y., Ogawa E., Uchiyama A., Ashida A., Uhara H., Goto Y., Okuyama R. Toll-like receptor 4 signaling promotes the migration of human melanoma cells. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2014, Vol. 234, no. 1, pp. 57-65.
108. Tjabringa G.S., Ninaber D.K., Drijfhout J.W., Rabe K.F., Hiemstra P.S. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2006, Vol. 140, no. 2, pp. 103-112.
109. Tokumaru S., Sayama K., Shirakata Y., Komatsuzawa H., Ouhara K., Hanakawa Y., Yahata Y., Dai X., Tohyama M., Nagai H., Yang L., Higashiyama S., Yoshimura A., Sugai M., Hashimoto K. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 7, pp. 4662-4668.
110. Vandamme D., Landuyt B., Luyten W., Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell. Immunol.*, 2012, Vol. 280, no. 1, pp. 22-35.
111. Vignoni M., de Alwis Weerasekera H., Simpson M.J., Phopase J., Mah T-F., Griffith M., Alarcon E.I., Scaiano J.C. LL37 peptide@silver nanoparticles: combining the best of the two worlds for skin infection control. *Nanoscale*, 2014, Vol. 6, no. 11, pp. 5725-5728.
112. von Haussen J., Koczulla R., Shaykhiev R., Herr C., Pinkenburg O., Reimer D., Wiewrodt R., Biesterfeld S., Aigner A., Czubyko F., Bals R. The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. *Lung Cancer*, 2008, Vol. 59, no. 1, pp. 12-23.

113. Wang L., Dong C., Li X., Han W., Su X. Anticancer potential of bioactive peptides from animal sources. *Oncol. Rep.*, 2017, Vol. 38, no. 2, pp. 637-651.
114. Wang W., Zheng Y., Jia J., Li C., Duan Q., Li R., Wang X., Shao Y., Chen C., Yan H. Antimicrobial peptide LL-37 promotes the viability and invasion of skin squamous cell carcinoma by upregulating YB-1. *Exp. Ther. Med.*, 2017, Vol. 14, no. 1, pp. 499-506.
115. Wang W., Jia J., Li C., Duan Q., Yang J., Wang X., Li R., Chen C., Yan H., Zheng Y. Antimicrobial peptide LL-37 promotes the proliferation and invasion of skin squamous cell carcinoma by upregulating DNA-binding protein A. *Oncol. Lett.*, 2016, Vol. 12, no. 3, pp. 1745-1752.
116. Weber G., Chamorro C.I., Granath F., Liljegren A., Zreika S., Saidak Z., Sandstedt B., Rotstein S., Mentaverri R., Sánchez F., Pivarcsi A., Stähle M. Human antimicrobial protein hCAP18/LL-37 promotes a metastatic phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2009, Vol. 11, R6. doi: 10.1186/bcr2221.
117. Wu W.K., Cho C.H., Lee C.W., Wu K., Fan D., Yu J., Sung J.J. Proteasome inhibition: a new therapeutic strategy to cancer treatment. *Cancer Lett.*, 2010, Vol. 293, no. 1, pp. 15-22.
118. Wu W.K., Sung J.J., To K.F., Yu L., Li H.T., Li Z.J., Chu K.M., Yu J., Cho C.H. The host defense peptide LL-37 activates the tumor-suppressing bone morphogenetic protein signaling via inhibition of proteasome in gastric cancer cells. *J. Cell. Physiol.*, 2010, Vol. 223, pp. 178-186.
119. Yan H.X., Wu H.P., Zhang H.L., Ashton C., Tong C., Wu J., Qian Q.J., Wang H.Y., Ying Q.L. DNA damage-induced sustained p53 activation contributes to inflammation-associated hepatocarcinogenesis in rats. *Oncogene*, 2013, Vol. 32, no. 38, pp. 4565-4571.
120. Yang D., Chertov O., Oppenheim J.J. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in antimicrobial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J. Leukoc. Biol.*, 2001, Vol. 69, no. 5, pp. 691-697.
121. Yang D., Chen Q., Schmidt A.P., Anderson G.M., Wang J.M., Wooters J., Oppenheim J.J., Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 7, pp. 1069-1074.
122. Zeng Q., Li S., Zhou Y., Ou W., Cai X., Zhang L., Huang W., Huang L., Wang Q. Interleukin-32 contributes to invasion and metastasis of primary lung adenocarcinoma via NF-kappaB induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression. *Cytokine*, 2014, Vol. 65, no. 1, pp. 24-32.
123. Zhao X., Wu H., Lu H., Li G., Huang Q. LAMP: a database linking antimicrobial peptides. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 6, e66557. doi: 10.1371/journal.pone.0066557.
124. Zharkova M.S., Orlov D.S., Golubeva O.Y., Chakchir O.B., Eliseev I.E., Grinchuk T.M., Shamova O.V. Application of antimicrobial peptides of the innate immune system in combination with conventional antibiotics—a novel way to combat antibiotic resistance? *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2019, Vol. 9, 128. doi: 10.3389/fcimb.2019.00128.
125. Zhu Y., Wang P.P., Zhai G., Bapat B., Savas S., Woodrow J.R., Sharma I., Li Y., Zhou X., Yang N., Campbell P.T., Dicks E., Parfrey P.S., McLaughlin J.R. Vitamin D receptor and calcium-sensing receptor polymorphisms and colorectal cancer survival in the Newfoundland population. *Br. J. Cancer*, 2017, Vol. 117, no. 6, pp. 898-906.
126. Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.M. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, Vol. 62, no. 9, pp. 971-988.

Авторы:

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

Орлов Д.С. — к.м.н., доцент, заведующий лабораторией иммунопатофизиологии отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Шамова О.В. — д.б.н., доцент, член-корр. РАН, заведующая отделом общей патологии и патологической физиологии, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; профессор кафедры биохимии, биологический факультет ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Chernov A.N., Research Associate, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Orlov D.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Laboratory of Immunopathophysiology, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Shamova O.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Deputy Director for Research, Institute of Experimental Medicine; Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 24.06.2021
Принята к печати 29.09.2021

Received 24.06.2021
Accepted 29.09.2021

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТРАНСФУЗИЙ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ РЕЦИПИЕНТА

Глазанова Т.В.¹, Шилова Е.Р.¹, Чечеткин А.В.¹, Бубнова Л.Н.^{1,2}

¹ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Переливания компонентов крови являются неотъемлемой частью лечебных мероприятий при ряде патологических состояний. Однако при проведении гемокомпонентной терапии важно учитывать вероятность посттрансфузионных осложнений, основную часть которых составляют иммунообусловленные побочные явления. Неблагоприятные последствия гемотрансфузий могут проявляться спустя длительный период времени, а патогенез данных явлений может быть ассоциирован не только с наличием аллоантител. Причиной могут быть аллоиммунизация к антигенам HLA, факторы лейкоцитарного происхождения, включая цитокины, продукты дегрануляции лейкоцитов, а также феномен повреждения эритроцитов при хранении ("storage lesion"), иммуномодулирующие свойства внеклеточных везикул или микрочастиц, содержащихся в компонентах крови, и другие факторы.

Несмотря на значительное количество публикаций по данной проблеме, остается ряд нерешенных вопросов, связанных с воздействием трансфузий компонентов крови на иммунную систему реципиентов. В обзоре литературы приводятся результаты современных исследований, посвященных изучению данного феномена. Рассматриваются выявленные в последние годы особенности трансфузионно-обусловленной иммуномодуляции (ТОИМ), при переливании различных компонентов крови. Приводятся результаты современных исследований, посвященных изучению данного феномена. Освещена роль плазменных факторов, микрочастиц, тромбоцитов и эритроцитов, HLA-сенсibilизации и микрохимизма в развитии ТОИМ, приводятся данные об особенностях возникновения ТОИМ в периоперационном периоде. Отдельный раздел обзора содержит сведения о клинических исследованиях, проводившихся за последние годы и посвященных проблеме ТОИМ, в том числе в группах новорожденных, пациентов со злокачественными новообразованиями, у иммунокомпрометированных пациентов после операций на сердце и сосудах. Освещаются данные по частоте наличия феномена ТОИМ у пациентов с ослабленной предыдущим заболеванием или проводимым лечением иммунной системой, наличием выраженной коморбидности, обширным хирургическим торакальным/абдоминальным вмешательством и искусственным кровообращением.

На основании проведенных исследований обсуждается роль в снижении частоты развития ТОИМ таких мероприятий при заготовке компонентов крови, как отмывание концентратов эритроцитов, лейкодеплеция, гамма-облучение. Данные опубликованных научных исследований не позволяют окончательно сделать определенные выводы о воздействии трансфузий компонентов крови на им-

Адрес для переписки:

Глазанова Татьяна Валентиновна
ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт
гематологии и трансфузиологии Федерального медико-
биологического агентства»
191024, Россия, Санкт-Петербург,
ул. 2-ая Советская, 16.
Тел.: 8 (921) 997-51-31.
E-mail: tatyana-glazanova@yandex.ru

Address for correspondence:

Glazanova Tatyana V.
Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology,
Federal Medical and Biological Agency
191024, Russian Federation, St. Petersburg,
2nd Sovetskaya, 16.
Phone: 7 (921) 997-51-31.
E-mail: tatyana-glazanova@yandex.ru

Образец цитирования:

Т.В. Глазанова, Е.Р. Шилова, А.В. Чечеткин,
Л.Н. Бубнова «Воздействие трансфузий компонентов
крови на иммунную систему реципиента» // *Медицинская иммунология*, 2021. Т. 23, № 6.
С. 1307-1318.
doi: 10.15789/1563-0625-IOT-2372
© Глазанова Т.В. и соавт., 2021

For citation:

T.V. Glazanova, E.R. Shilova, A.V. Chechetkin,
L.N. Bubnova "Impact of transfusion of blood components
on the recipient immune system", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 6,
pp. 1307-1318.
doi: 10.15789/1563-0625-IOT-2372
DOI: 10.15789/1563-0625-IOT-2372

мунную систему реципиентов в связи с различием изучаемых групп больных, особенностей исследуемых нозологий и клинических ситуаций, разноплановостью гемокомпонентов, а также различных стандартов трансфузионной терапии, принятых в разных странах. Тем не менее систематизированный обзор литературы может помочь ориентироваться в вопросах трансфузионно-обусловленной иммуномодуляции.

Ключевые слова: трансфузии компонентов крови, трансфузионно-обусловленная иммуномодуляция, аллоиммунизация

IMPACT OF TRANSFUSION OF BLOOD COMPONENTS ON THE RECIPIENT IMMUNE SYSTEM

Glazanova T.V.^a, Shilova E.R.^a, Chechetkin A.V.^a, Bubnova L.N.^{a, b}

^a Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Transfusions of blood provide essential therapeutic measures in a number of pathological conditions. However, when carrying out blood component therapy, it is important to consider probability of post-transfusion complications. Most of them are immune-mediated side effects. The unfavorable consequences of blood transfusions can manifest at long-range time periods, and pathogenesis of these phenomena may be associated not only with the presence of alloantibodies. They may be caused by alloimmunization to HLA antigens, leukocyte factors, including cytokines, products of leukocyte degranulation, as well as storage-related erythrocyte damage («storage lesion»), immunomodulatory properties of extracellular vesicles or microparticles derived from blood components, and other factors.

Despite significant number of publications on this issue, a lot of unresolved issues still remain, concerning transfusion-related effects of blood components on the immune system of recipients. The review article provides the results of current studies in this area. We present and discuss the results of current studies and the features of transfusion-mediated immunomodulation (TRIM) revealed over recent years, when transfusing different blood components. The role of plasma factors, microparticles, platelets and erythrocytes, HLA sensitization and microchimerism in the development of TRIM is highlighted, the data on occurrence and clinical features of TRIM in perioperative period are presented. A separate section of the review provides information about recent clinical studies, devoted to the issues of TRIM in different clinical cohorts, including newborns, patients with malignant neoplasms, immunocompromised patients after heart and vascular surgery. The data on TRIM incidence in the patients with exhausted immune system due to previous disease or treatment, severe comorbidity, extensive surgical thoracic/abdominal intervention and artificial circulation are also in scope.

As based on the studies performed, the role of distinct measures, e.g., washing of erythrocyte concentrates, leukodepletion, and gamma irradiation are discussed in view of potential TRIM prevention. The results of published research do not allow us to draw definite conclusions about the effects of blood component transfusion on the immune system of recipients with respect to differences between the studied groups of patients, characteristics of the studied disorders and clinical situations, diversity of hemocomponents, as well as varying standards of transfusion therapy adopted in different countries. However, the systematic literature review may provide some guidance in transfusion-mediated immune modulation.

Keywords: blood components, transfusion, transfusion-related immunomodulation, alloimmunization

Хорошо известны побочные проявления у реципиентов, являющиеся следствием переливания крови или её компонентов, которые возникают непосредственно во время трансфузии или вскоре после нее [1]. Среди посттрансфузионных осложнений, в основе которых лежат иммунные механизмы, особо выделяется трансфузионно-обусловленное острое повреждение легких (TRALI), при котором триггером является переливание трансфузионной среды, содержащей

анти-HLA антитела (свежезамороженная плазма, концентрат тромбоцитов или эритроцитов, криопреципитат), и посттрансфузионная реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Однако неблагоприятные последствия без явно выраженных клинических проявлений могут проявляться спустя дни, недели и даже годы, а патогенез иммунообусловленных побочных явлений может быть ассоциирован не только с наличием аллоантител.

В последние четыре десятилетия публиковались результаты многих фундаментальных клинических и экспериментальных исследований, проведенных в различных странах мира, которые обозначили важную проблему — иммуномодулирующее действие аллогенных трансфузий компонентов крови (КК). Феномен трансфузионно-обусловленной иммуномодуляции (ТОИМ) изучался главным образом в трех клинических ситуациях: увеличении срока приживления аллогенного почечного трансплантата после переливаний крови; увеличении частоты возникновения рецидивов солидных опухолей после их хирургической резекции; увеличении частоты возникновения инфекционных осложнений у пациентов в послеоперационном периоде [36].

В течение долгого периода попытки установления механизмов, лежащих в основе ТОИМ, были сфокусированы на аллогенных донорских лейкоцитах и вырабатываемых ими цитокинах [71]. Предшествующие исследования показали, что проявления ТОИМ могут быть ослаблены в результате переливаний не обедненных лейкоцитами эритроцитосодержащих КК (ЭКК) или КК после лейкодеплеции. Соответственно, при переходе на тактику гемокомпонентной терапии с использованием современных сепараторов и лейкоцитарных фильтров можно было ожидать сведение к минимуму вероятности развития данного явления. Однако в последующем ряд работ показал, что даже трансфузии эритроцитной массы, обедненной лейкоцитами и тромбоцитами, могут быть ассоциированы с трехкратным увеличением частоты рецидивов солидных опухолей, что свидетельствовало о способности эритроцитов и продуктов их деятельности вызывать угнетение иммунной системы реципиента [43].

Более выраженный характер ТОИМ при переливаниях цельной крови исследователи относили не только за счет инфузий аллогенных лейкоцитов, но также плазмы или микрочастиц [61]. В то же время оказалось, что клинические проявления, обусловленные ТОИМ, могут варьировать у пациентов с различными видами злокачественных новообразований. Это позволяет предположить, что различные физиологические состояния могут осложнять трансфузионно-обусловленную иммуносупрессию [33]. На сегодняшний день данное состояние рассматривается как многофакторный феномен, в развитии которого задействован целый ряд патологических процессов.

Плазменные факторы

Так как ТОИМ может развиваться после применения плазмы и лейкоредуцированных КК, предшествующие исследования связывали развитие ТОИМ с применением присутствующей в переливаемых КК аллогенной плазмы, включая иммуномедиаторы, который могли появиться в процессе хранения. Эндотелий играет важную

роль в развитии ответа тканей на воспалительные стимулы. Активация эндотелиальных клеток в процессе воспалительного ответа, как правило, индуцируется провоспалительными цитокинами, что приводит к накоплению лейкоцитов в местах клеточного повреждения [57]. Процесс накопления лейкоцитов развивается через экспрессию некоторых молекул адгезии и хемокинов, таких как фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF), растворимая молекула межклеточной адгезии (sICAM-1) и IL-8. MIF вызывает остановку процесса роллинга лейкоцитов, sICAM-1 способствует адгезии лейкоцитов, а IL-8 — миграции лейкоцитов из сосудистого русла. Отмечено повышение уровня MIF и sICAM-1 в сыворотке крови пациентов в посттрансфузионном периоде, кроме того, быстрое увеличение содержания MIF наблюдалось у недоношенных новорожденных с некротизирующим энтероколитом [59]. Повышенные концентрации этих факторов могут вносить свой вклад в развитие ТОИМ.

Микрочастицы

В последнее время иммуномодулирующие свойства внеклеточных везикул, или микрочастиц (МЧ), содержащихся в КК, широко изучаются в трансфузионной медицине [76]. Термин «микрочастицы» включает МЧ более крупного размера (200-1200 нм), экзосомы (30-150 нм) или апоптотические тельца (50-500 нм) [46]. Известно, что плазма здоровых лиц содержит МЧ, включая экзосомы, лейкоцитарного, тромбоцитарного и эритроцитарного происхождения, а также образованные эндотелиальными клетками [22]. МЧ могут играть важную роль в развитии иммуномодулирующих эффектов [19]. Так, установлено, что МЧ, накапливающиеся в ЭКК в процессе хранения, участвуют в процессах прайминга и активации нейтрофилов, и таким образом усиливают воспалительный ответ при переливании пациентам эритроцитов после длительного хранения [12].

Было показано, что МЧ, содержащиеся в хранящихся дозах ЭКК, могут усиливать активность воспалительных хемокинов посредством взаимодействия с тромбоцитами *in vivo* [74]. Тромбоцитарные МЧ, экспрессирующие CD40L, могут доставлять сигналы В-клеткам для стимуляции выработки иммуноглобулинов G и осуществления адаптивного иммунного ответа для поддержания функционирования CD4⁺T-клеток [2]. Это не прямое взаимодействие МЧ и Т-клеток было продемонстрировано Danesh A. с соавт. [19], которые предположили, что блокирование рецептора CD40L может препятствовать Т-клеточной пролиферации. Кроме того, существуют и другие пути воздействия МЧ на процессы воспаления или коагуляции, например наличие на их поверхности фосфатидилсерина, который может служить триггером выработки некоторых тканевых факторов [7]. Результаты ряда исследований

показали и другие эффекты МЧ в отношении иммунной системы, включая их способность усиливать выработку цитокинов и хемокинов, стимулировать пролиферацию Т-клеток и индуцировать выработку TNF α моноцитами [12, 76]. В работе Muszynski J. и соавт. [50] высказано предположение, что воздействие хранимых ЭКК на иммуносупрессивные свойства моноцитов обусловлено связанными с белками молекулами РНК, а не самими МЧ, содержащимися в дозах эритроцитов. Следует заметить, что расхождения в результатах разных исследований, описывающих отличающиеся механизмы, могут быть связаны с рядом факторов, включая различия в изучаемых компонентах крови, методах изучения и других процедурах.

Показано, что МЧ могут переносить генетическую информацию, в том числе, микроРНК, играющую важную роль в регуляции функций иммунной системы [2]. Участие в передаче генетической информации — это одна из наиболее интересных функций МЧ [68]. МикроРНК — это малого размера некодирующие молекулы РНК, которые служат регуляторными молекулами при различных биологических/патологических состояниях, таких как воспаление и иммунный ответ. В организме клетки высвобождают МЧ, которые могут содержать микроРНК, в различные жидкости для осуществления контактов с клетками-мишенями [75]. С момента открытия роли микроРНК в процессах иммуномодуляции было установлено большое количество уникальных типов микроРНК, которые могут регулировать иммунный ответ, выступая как промоторы или ингибиторы процессов транскрипции в иммунных клетках. Эти типы микроРНК можно обнаружить во внеклеточном окружении в связанном с липопротеинами высокой плотности виде, или упакованными внутри МЧ с тем, чтобы защищать себя от деградации и усиливать эффективный транспорт и межклеточные взаимодействия [24].

Тромбоциты

МЧ тромбоцитарного происхождения могут служить переносчиками информации, оказывая при этом воздействие на иммунную систему реципиента КК [24], в частности через созревание антиген-презентирующих клеток, например дендритных клеток (ДК) [62]. Существует два типа ДК: миелоидного происхождения и плазмациитоидные ДК. Плазмациитоидные ДК являются наиболее выраженными продуцентами IFN α , они влияют на дифференцировку CD4⁺Т-клеток в направлении Т-хелперов 1-го типа (Th1), продуцируя IL-10 и ингибируя выработку IL-12 ДК миелоидного происхождения, или стимулируя развитие Т-регуляторных клеток (Treg), что, в свою очередь, приводит к угнетению антиген-специфичного иммунного ответа [16, 60]. С другой стороны, продукция IL-12 миелоидными ДК стимулирует выработку IFN γ Т-клетками и НК-

клетками, приводя к сдвигу в сторону иммунного ответа по типу Th1.

Было проведено исследование *in vitro* с целью охарактеризовать иммунный профиль миелоидных ДК и отдельной субпопуляции ДК, экспрессирующих антиген BDCA31, после их взаимодействия с криоконсервированными тромбоцитами [41]. На модели трансфузии, используя цельную кровь, изучали влияние криоконсервированных тромбоцитов на миелоидные ДК и экспрессию дендритными клетками антигена BDCA31, а также на выработку медиаторов воспаления. Авторы показали, что криоконсервированные тромбоциты оказывали минимальное влияние на миелоидные ДК, однако значительно модулировали ответ BDCA31⁺ ДК *in vitro*. Взаимодействие с криоконсервированными тромбоцитами приводило к усилению экспрессии антигена CD86 и угнетению продукции IL-8, TNF α и IFN γ -индуцибельного белка — IP-10. Моделирование инфекционных процессов *in vitro* показало, что криоконсервированные тромбоциты ингибировали экспрессию BDCA31⁺ ДК антигенов CD40, CD80 и CD83, и угнетало продукцию ими IL-8, IL-12 и TNF α . Таким образом, криоконсервированные тромбоциты могут оказывать иммуносупрессивный эффект, более отчетливо выраженный в тех случаях, когда одновременно активируются процессы, ассоциированные с развитием инфекции, в особенности это касается популяции ДК, несущих антиген BDCA31.

Известно, что во время хранения тромбоцитов в криоконсервированном виде некоторые их свойства могут меняться. Концентраты тромбоцитов получают обычно с помощью афереза, подвергают лейкоредукции и хранят при 20-24 °С в течение 5 дней. При хранении тромбоцитов их активация частично сохраняется, в процессе трансфузии реципиенту это может приводить к немедленному высвобождению биологически активных липидов, ростовых факторов, хемокинов, цитокинов и аккумулированных микрочастиц, что оказывает значимый эффект на иммунную функцию реципиентов и процессы опухолевого роста [69]. Ростовые факторы, включая факторы роста эндотелия сосудов (VEGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста фибробластов 2-го типа (FGF2), мозговой нейротрофический фактор (BDNF), эпидермальный фактор роста (EGF) и трансформирующий фактор роста β 1 (TGF- β 1), присутствуют в лейкоредуцированных концентратах тромбоцитов после их 6-дневного хранения [38, 65], а отмывка существенно снижает концентрацию большинства из перечисленных факторов. Следует отметить данные о том, что концентрация TGF- β 1 в плазме реципиентов возрастала в течение часа после трансфузии тромбоцитов [6]. Кроме того, в эксперименте показано, что добавление супернатантов, полученных из концентратов тромбоцитов, усиливает

рост и инвазивность опухолевых клеток в культуре [32]. Как и для ростовых факторов, концентрации в плазме реципиента цитокинов и хемокинов возрастали через час после трансфузий концентрата тромбоцитов [6].

Лейкоциты

Существует множество факторов лейкоцитарного происхождения, включая цитокины, продукты дегрануляции лейкоцитов, растворимые молекулы FasL (sFas-L) и HLA, которые непосредственно участвуют в угнетении иммунного ответа [26]. Из перечисленных факторов наибольшее число доказательств этого эффекта собрано для sFasL и противовоспалительного цитокина TGF- β , свидетельствуя о том, что они могут являться промоторами ТОИМ, в частности при переливании не лейкоредуцированных КК [26]. Результаты исследований *in vitro* показали, что sFasL и TGF- β , обнаруживаемые в КК, могут индуцировать апоптоз клеток, отвечающих за врожденный иммунитет, нарушать процесс хемотаксиса нейтрофилов и снижать активность NK-клеток [70]. Помимо противовоспалительных, провоспалительные цитокины также могут накапливаться в КК в процессе их хранения. Однако в некоторых сообщениях говорится о том, что лейкоредукция, выполненная перед началом хранения, приводила к существенному уменьшению содержания провоспалительных цитокинов в ЭКК, вплоть до их полного исчезновения [40, 52]. Наряду с цитокинами, в ЭКК были обнаружены продукты дегрануляции лейкоцитов, такие как гистамин и эозинофильный катионный белок, обладающие иммуномодулирующими свойствами. Так, показано, что гистамин ингибирует хемотаксис нейтрофилов, а эозинофильный катионный белок может снижать пролиферацию Т-клеток [14]. Несмотря на то, что эффекты лейкоцитов и вырабатываемых ими факторов на развитие ТОИМ существенно снижаются после лейкоредукции, выполненной сразу после заготовки КК, свидетельства наличия ТОИМ все же сохраняются и в лейкоредуцированных КК, поэтому, вероятно, в ее развитии принимают участие и другие факторы, не лейкоцитарного происхождения [50].

Эритроциты

Другой возможный механизм, обуславливающий ТОИМ, связан непосредственно с эритроцитами. В процессе их хранения в охлажденном состоянии развивается хорошо описанный феномен повреждения при хранении ("storage lesion(s)"). Гемолиз эритроцитов (происходящий как в процессе хранения, так и после выполнения трансфузий), может приводить к снижению рН, увеличению содержания лактатов и других продуктов метаболизма и высвобождению МЧ, а также к аккумулярованию свободного гемоглобина, гема и железа [9, 58, 73]. Перегрузка железом может оказывать эффект на иммунную

систему посредством воздействия на «нутриционный иммунитет» (термин, исходно введенный для обозначения ограничения организмом хозяина доступности поступающего в организм железа), а также через усиление вирулентности ряда патогенов [33]. Кроме того, усугубление иммуносупрессии возможно в результате вызванных перегрузкой железом нарушений пролиферации и активации Т-, В- и NK-клеток [72]. Высказана гипотеза о том, что гемолиз эритроцитов в процессе их хранения приводит к увеличению доступности несвязанного с гемом железа, которое угнетает активацию макрофагов. Для изучения этого вопроса эритроциты отбирали для анализа в различные временные точки, чтобы оценить степень гемолиза и высвобождения железа. На основании результатов исследования *in vitro* авторы показали, что содержание продуктов гемолиза достоверно увеличивается в процессе хранения эритроцитов; соединения трехвалентного железа и плазма, полученная из хранимой крови, угнетали активацию клеток линии ТНР-1; эффект плазмы не был связан напрямую с увеличением содержания железа [55].

Наконец, еще одним компонентом, вносящим вклад в ТОИМ, является убиквитин, внутриклеточный регуляторный белок, присутствующий в различных типах клеток. Эритроциты содержат большое количество убиквитина, который во внеклеточной форме накапливается в ЭКК в процессе их хранения [56]. Внеклеточный убиквитин оказывает разнообразные эффекты на функцию иммунных клеток, включая снижение индуцированной липополисахаридом продукции TNF α и, наоборот, усиление ЛПС-индуцированной продукции IL-8 [77]. Также внеклеточный убиквитин, обнаруживаемый в дозах эритроцитов, может воздействовать на функцию Т-хелперов, изменяя их фенотип на Т-хелперы 2-го типа [56]. Морфологические изменения эритроцитов в процессе хранения сопровождаются слипчиванием и высвобождением МЧ [20]. Существуют данные о том, что отмывание концентратов эритроцитов с удалением содержащихся в них растворимых медиаторов и/или воспалительных факторов, включая МЧ, может приводить к улучшению результатов лечения пациентов. Так, было показано, что наличие в концентратах эритроцитов МЧ тромбоцитарного происхождения ассоциировано с провоспалительной активностью — увеличением содержания провоспалительных цитокинов/хемокинов: MCP-1, IL-8, TNF α , VCAM-1 и E-селектина. Так как отмывание приводило к выраженному уменьшению иммуномодулирующего эффекта ЭКК, то использование этого процесса при заготовке компонентов крови может улучшать результат трансфузий [76].

Феномен ТОИМ изучался также у новорожденных, которые получали трансфузии ЭКК. Исследовали динамику изменения содержания

IL-8 и sICAM-1 как маркеров ТОИМ у недоношенных новорожденных различного постнатального возраста — от 0 до 14 дней и от 15 до 28 дней. Результаты показали прямую корреляцию содержания IL-8 в трансфузионном контейнере с посттрансфузионным уровнем этого цитокина в плазме крови у детей более позднего постнатального возраста, что можно отнести за счет прямого переноса этого фактора с переливаемым материалом. Однако в целом авторами не было получено доказательств иммуномодулирующего эффекта трансфузий эритроцитарной массы у недоношенных новорожденных [42].

HLA-аллоиммунизация

Известно, что в результате трансфузии тромбоцитов может возникать аллоиммунизация к антигенам HLA. Предполагается, что применение патогенредуцированных концентратов тромбоцитов (КТ) приводит к снижению HLA-аллоиммунизации и сопутствующей этому рефрактерности к трансфузиям. Проводилось изучение HLA-аллоиммунизации на образцах, полученных у онкогематологических пациентов, рандомизированных в исследование PREPAREs (Pathogen Reduction Evaluation and Predictive Analytical Rating Score) и получавших либо КК без удаления патогенов, либо патогенредуцированные при помощи устройств Mirasol (Terumo BCT Inc.) [63]. Определяли антитела к HLA I и II класса перед первой трансфузией тромбоцитов и через неделю после нее, используя мультиплексный анализ со стандартными пороговыми значениями для выявления как низкого, так и высокого уровня антител. Установлено, что среди пациентов, у которых на момент включения в исследование анти-HLA антитела отсутствовали, у 5,4% появились анти-HLA антитела I класса после трансфузии необработанных концентратов тромбоцитов, тогда как среди пациентов, получавших патогенредуцированные КТ, возникновение антител наблюдалось в 12,8% случаев. Образование анти-HLA антител II класса было сопоставимо в группах пациентов, получавших оба вида КТ. Авторы делают заключение, что инактивация патогенов с помощью системы Mirasol не приводит к предупреждению развития аллоиммунизации к антигенам HLA I и II класса после трансфузий тромбоцитов.

Использование устройства для поддержки функции желудочков (Ventricular assist device) является важным элементом терапии терминальной стадии сердечной недостаточности, которое приводит к улучшению выживаемости, но связано с выработкой анти-HLA антител.

Была исследована частота возникновения анти-HLA антител и влияющие на это факторы у пациентов различного возраста, получавших лейкоредуцированные компоненты крови, после установки устройства для поддержки функции желудочков. Проведен ретроспективный анализ

за период с 2005 по 2014 год. В исследованную когорту вошли как взрослые, так и пациенты детского возраста. В течение первого года после установки устройства для поддержки функции желудочков у 31% и 8% пациентов выявлялись анти-HLA антитела к антигенам I и II класса соответственно. Доля вновь сенсибилизированных пациентов среди взрослых и детей оказалась примерно одинаковой [28].

Воздействие трансфузий эритроцитов и тромбоцитов на иммунный ответ, оцениваемое по выработке аллоантител и содержанию иммунорегуляторных клеток, изучалось у иммунокомпрометированных пациентов после операций на сердце и сосудах [53]. Пациентов случайным образом делили на группы, получавшие стандартные немодифицированные (standard unmodified), лейкоредуцированные или лейкоредуцированные γ -облученные эритроциты. Влияние трансфузий на адаптивный и врожденный иммунитет оценивали по содержанию Т-регуляторных клеток (Treg) и инвариантных Т-натуральных киллерных клеток (iNKT). Показано, что лейкоредукция компонентов крови приводила к снижению выработки анти-HLA антител только у пациентов с наличием предсуществующих анти-HLA антител. Гамма-облучение лейкоредуцированных КК не приводило к снижению выработки анти-HLA аллоантител. По сравнению с пациентами без трансфузий реципиенты стандартных немодифицированных или лейкоредуцированных КК показали существенное увеличение содержания Т-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^{high}$, экспрессирующих FoxP3 или CTLA4, а также iNKT клеток, продуцирующих IL-4. Напротив, у реципиентов лейкоредуцированных γ -облученных компонентов крови наблюдалось существенно менее выраженное увеличение всех изученных показателей.

Трансфузии КК в периоперационном периоде

Трансфузии КК в периоперационном периоде могут приводить к значимым нарушениям в балансе провоспалительных и противовоспалительных факторов в организме реципиента. В этом отношении применение КК после их хранения может приводить к более выраженным последствиям, по сравнению со свежеприготовленными КК. Данные, полученные на животных, показывают, что «старые» эритроциты, в большей степени, нежели лейкоциты или растворимые фракции, могут быть промоторами опухолевого роста. Давно известно, что даже остаточные лейкоциты, сохраняющиеся в гемокомпонентах после лейкоредукции, способны модулировать иммунный ответ реципиента [13]. Значимые концентрации цитокинов определяются в лейкоредуцированных дозах гемокомпонентов после их хранения [11]. Кроме того, инкубация цельной крови с супернатантами, полученными из лейкоредуцированных эритроцитарных компонентов после хранения, стимулировала спонтанное вы-

свобождение IL-6, IL-10 и TNF α [39], приводила к снижению индуцированной липополисахаридом (ЛПС) продукции TNF α , [56] и индуцировала активацию регуляторных Treg [11]. Активация Treg является антиген-специфичной, так как они могут активироваться липополисахаридом (ЛПС) или через Toll-подобные рецепторы 4-го типа с приобретением иммуносупрессивных свойств [15]. Эти результаты могут объяснять тот факт, почему воспаление и иммуносупрессия могут сохраняться на фоне применения ЭКК после хранения, независимо от того, подвергались ли они лейкоредукции.

Помимо резидуальных лейкоцитов и биологически активных лейкоцитов, в дозах ЭКК также содержатся неполярные липиды и смесь провоспалительных лизофосфатидилхолинов (lyso-PC) [64]. Последние модулируют активность NKT- и Т-клеток [25], действуют как хемоаттрактанты NK-клеток [37], индуцируют созревание дендритных клеток [17] и стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов [54]. Эйкозаноиды (простагландины и тромбоксаны) также могут накапливаться в эритроцитной массе [35]. Основными эффектами этих биологических веществ является иммуносупрессия и стимуляция опухолевого роста [49, 66].

Возможно, наиболее полные результаты вероятного эффекта периперационных гемотрансфузий на развитие рецидива опухолей были получены в результате объемного метаанализа, проведенного Кокрейновской группой и включавшего рандомизированные контролируемые исследования, наряду с проспективными и ретроспективными наблюдательными исследованиями. Суммарная оценка эффекта периперационных гемотрансфузий на возникновение рецидива опухоли по результатам рандомизированных исследований показала величину отношения шансов (OR) 1,42 (95% доверительный интервал, 1,20-1,67, $p < 0,0001$) для пациентов, получавших трансфузии. Хотя наблюдалась гетерогенность изученных групп, стратифицированный метаанализ подтвердил полученные результаты, с разделением на группы по локализации опухоли и стадии заболевания, срокам проведения трансфузий КК, типу КК и объему трансфузий. Однако, с учетом гетерогенности и невозможности оценить эффект непосредственно хирургического вмешательства, авторам не удалось установить определенную причинно-следственную связь между возникновением рецидивов опухоли и гемотрансфузиями, выполненными в периперационном периоде [3].

В то же время можно предположить, что глущина цитопении, ассоциированной с опухолевым процессом и требующей коррекции с помощью КК, в ряде случаев может быть отражением значительного объема опухолевой массы и менее благоприятного прогноза. Как потенциальный

негативно влияющий на возникновение рецидива опухоли фактор не исключается также продолжительное хранение доз переливавшихся КК. Так, в опытах на животных показано, что длительное хранение переливавшихся эритроцитов приводило к усилению опухолевой прогрессии [8].

В исследовании Hassani Н. и соавт. [29] концентрацию TGF- β и TNF α изучали у пациентов, перенесших ортопедические операции и получавших во время вмешательства трансфузии аллогенных эритроцитов. Пред- и послеоперационные уровни TNF α и TGF- β не показали достоверных различий между группами, получавшими и не получавшими ЭКК, однако в обеих группах наблюдалось достоверное повышение уровня этих цитокинов после операции. Авторы делают вывод о том, что, вероятно, изменение содержания TNF α и TGF- β связано в большей степени с самим оперативным вмешательством.

Было проведено исследование [45] по оценке влияния реинфузии оставшейся после лейкофилтрации крови на клеточный иммунитет в послеоперационном периоде у пациентов после подключения к аппарату искусственного кровообращения (АИК). Группу из 40 пациентов случайным образом поделили на контрольную и экспериментальную, по 20 человек в каждой. Пациенты экспериментальной группы получали трансфузию крови, оставшейся в АИК после лейкофилтрации и хранения в стерильных мешках. Пациентам контрольной группы переливали оставшуюся кровь, также хранившуюся в стерильных мешках, но не прошедшую лейкофилтрацию. Реинфузию оставшейся в АИК крови выполняли пациентам обеих групп после ИК. По результатам исследования авторами сделан вывод о том, что реинфузия оставшейся после лейкофилтрации крови вызывает угнетение воспалительного ответа (снижение содержания в плазме TNF α , IL-6 и IL-8), не влияя на показатели клеточного иммунитета (содержание CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и NK-клеток) и не приводя к увеличению частоты развития инфекций в послеоперационном периоде.

Клинические исследования

В январе 2019 г. была опубликована статья с данными, полученными с сайта clinicaltrials.gov, с информацией и перечнем клинических исследований, посвященных проблемам трансфузиологии, которые находились в процессе выполнения и ожидали завершения и опубликования в 2019 г. [23]. На конец октября 2019 г. предварительные результаты только одного из этих исследований были опубликованы в информационной базе Pubmed, Одиннадцать исследований продолжают набор пациентов, что свидетельствует о множестве проблем, которые возникают у исследователей, выполняющих клинические исследования по трансфузиологии. Два исследования

были закрыты досрочно в связи с низким уровнем набора пациентов.

Среди этих исследований лишь одно было посвящено вопросам изучения ТОИМ. Так, целью проспективного наблюдательного клинического исследования с названием Immunomodulation Effect of Blood Transfusion. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02140216, которое выполнялось с мая 2014 г. по апрель 2018 г., была проверка гипотезы о том, что трансфузии эритроцитов приводят к индукции иммунного ответа у пациентов хирургического профиля. В исследование вошли пациенты низкого риска с неонкологическими заболеваниями в возрасте от 18 до 75 лет, подвергшиеся плановому оперативному лечению позвоночника, часть из которых получала трансфузии эритроцитов. Образцы крови пациентов забирали перед операцией и на 1-е, 3-и и 5-е сутки после операции для определения содержания лабораторных показателей [67]. На основании результатов определения 45 иммунологических параметров авторам не удалось установить какого-либо значимого иммуномодулирующего эффекта трансфузий эритроцитов; достоверные изменения были установлены лишь для пяти малозначимых цитокинов (IL-9 (повышение), B-FGF (снижение), IFN γ (снижение во всех группах, выраженное даже более значительно у пациентов, не получавших трансфузии), IP10 (снижение), MIP-1 α (повышение). В целом перечисленные изменения были незначительными и неспецифичными.

Таким образом, по результатам клинического исследования был сделан вывод о том, что сами по себе трансфузии эритроцитов не вызывают иммунный ответ у пациентов хирургического профиля без сопутствующей патологии. Полученные данные в целом не отрицают наличие феномена ТОИМ, которая главным образом наблюдается у пациентов с ослабленной предыдущим заболеванием или проводимым лечением иммунной системой, например в случае злокачественных новообразований, наличием выраженной коморбидности, обширным хирургическим торакальным/абдоминальным вмешательством и искусственным кровообращением.

Целью другого клинического исследования [21] было изучение влияния трансфузий лейкоредуцированных ЭКК на возникновение инфекционных осложнений в послеоперационном периоде, безрецидивную и общую выживаемость. В ретроспективное исследование были включены пациенты с I–III стадией аденокарциномы толстого кишечника, которым была выполнена плановая резекция опухоли в период с 2003 г. по 2010 г., из них 22% получали лейкоредуцированные трансфузии эритроцитов. Статистический анализ показал независимые ассоциативные связи трансфузий лейкоредуцированных эритроцитов с увеличением частоты возникнове-

ния инфекционных осложнений, повышением вероятности рецидива рака и снижением общей выживаемости у пациентов, которым было перелито 3 и более доз эритроцитов, независимо от выполнения лейкоредукции. Ретроспективный анализ в когортах проспективной базы данных пациентов, которым была выполнена радикальная операция по поводу первичного рака яичников в период 2006–2014 гг., проведен группой авторов [34]. При сравнении выживаемости без прогрессии в группах пациентов, получавших и не получавших трансфузии ЭКК в периоперационном периоде, не было выявлено повышения риска рецидивов рака яичников на фоне трансфузий.

Микрохимеризм

Несмотря на использование лейкодеплеции при трансфузиях КК, приживление в организме реципиента донорских лейкоцитов (микрохимеризм) сохраняется в течение продолжительного времени после выполнения трансфузий эритроцитов. На частоту возникновения микрохимеризма могут влиять различия в методах заготовки компонентов крови и правилах выполнения трансфузий КК, принятые в разных странах. В группе пациентов из Австралии, получавших трансфузии эритроцитов в связи с травмой (тяжесть более 15 по шкале ISS – injury severity score) в период с 2000 г. по 2012 г., изучали особенности микрохимеризма после трансфузий КК [30]. Преобладание микрохимеризма устанавливали с помощью генетического скрининга с использованием панели биаллельных полиморфных вариантов с инсерциями/делециями. В среднем период хранения эритроцитов до переливания составил 20 ± 8 дней, а средняя продолжительность госпитализации – 40 ± 39 дней. Какие-либо значимые различия по возрасту, полу пациентов, числу полученных доз эритроцитов и степени тяжести травмы отсутствовали. Микрохимеризм был обнаружен у 16,3% пациентов, получивших компоненты крови без лейкодеплеции, и у 9,6% пациентов, получивших трансфузии ЭКК после лейкодеплеции. Таким образом, несмотря на введение в Австралии правил выполнения лейкодеплеции всех компонентов крови, частота развития трансфузионно-обусловленного микрохимеризма существенно не изменилась. При этом у половины пациентов с микрохимеризмом имелось травматическое повреждение селезенки или показания к спленэктомии на момент выполнения трансфузии.

У пациентов после травмы, получивших в период 2012–2016 гг. трансфузии как минимум 5 доз эритроцитов в течение 4 часов, исследовали содержание выживших донорских лейкоцитов и изменения уровня цитокинов [30]. Контрольной группой служили пациенты с такой же тяжестью травмы, которым не требовалось трансфузий КК. Пациенты, которым проводились трансфузии,

в среднем получили 11 доз эритроцитов и лишь 27,5% пришли на повторное исследование после выписки. Из них у одного пациента наблюдалась инсерция/делеция, указывающая на наличие микрохимеризма, тогда как ни у одного из пациентов контрольной группы микрохимеризма выявлено не было. При этом у пациентов, получавших трансфузии, установлено повышение содержания уровня цитокинов IL-10 и IL-6, однако корреляции между микрохимеризмом и содержанием цитокинов не установлено.

Возникновение микрохимеризма и особенности иммунного ответа изучались также в процессе рандомизированного одноцентрового исследования у пациентов, которым было выполнено оперативное вмешательство по поводу солидных опухолей и которые получали в периоперационном периоде немодифицированные ЭКК или лейкоредуцированные ЭКК [44]. Микрохимеризм был выявлен у 45% пациентов, получавших немодифицированные ЭКК, и ни у одного из пациентов, получивших трансфузии лейкоредуцированных ЭКК. Наличие микрохимеризма было ассоциировано с более выраженной продукцией IL-10 и снижением содержания CD56⁺ клеток по сравнению с пациентами, у которых не наблюдалось микрохимеризма. При этом продукция IL-12, сниженная сразу после выполнения хи-

рургической операции и трансфузии, в дальнейшем возрастала, причем более выражено — после трансфузии немодифицированных ЭКК по сравнению с группой, получавшей лейкоредуцированные ЭКК.

Таким образом, несмотря на проводимые в течение достаточно длительного периода обширные исследования, целью которых было изучение феномена трансфузионно-обусловленной иммуномодуляции, исчерпывающих и однозначных результатов пока не получено. До сих пор невозможно окончательно сделать какие-либо определенные выводы о воздействии трансфузий компонентов крови на иммунную систему реципиентов. Это может быть обусловлено такими факторами, как различие изучаемых групп пациентов, особенности исследуемых нозологий и клинических ситуаций, разноплановость гемоконпонентной терапии и разнообразие сроков и продолжительности ее использования, а также различные стандарты трансфузионной терапии, принятые в разных странах. Тем не менее проблема иммунологической безопасности трансфузий компонентов крови, несомненно, требует внимания и дальнейшего изучения, в особенности в отношении иммунокомпрометированных пациентов.

Список литературы / References

1. Эйхлер О.В., Четчин А.В., Аджигова Е.В., Данильченко В.В., Минеева Н.В., Солдатенков В.Е., Кроби́нец И.И. Характеристика осложнений, возникших после переливания донорской крови и ее компонентов, в медицинских организациях Российской Федерации в 2018 году // Трансфузиология, 2019. Т.20, № 4. С. 301-309. [Eikhler O.V., Chechetkin A.V., Adzhigitova E.V., Danilchenko V.V., Mineeva N.V., Soldatenkov V.E., Krobins I.I. Characteristics of complications occurring after transfusion of donor blood and its components, in medical establishments of the Russian Federation in 2018. *Transfuziologiya = Transfusiology*, 2019, Vol. 20, no. 4, pp. 301-309. (In Russ.)]
2. Aatonen M., Gronholm M., Siljander P. Platelet-derived microvesicles: multitasking participants in intercellular communication. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2012, Vol. 38, no. 1, pp. 102-113.
3. Amato A, Pescatori M. Perioperative blood transfusions for the recurrence of colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2006, Vol. 1, CD005033. doi: 10.1002/14651858.CD005033.pub2.
4. Almizraq R., Seghatchian J., Acker J. Extracellular vesicles in transfusion-related immunomodulation and the role of blood component manufacturing. *Transfus. Apher. Sci.*, 2016, Vol. 55, no. 3, pp. 281-291.
5. Almizraq R., Kipkeu B., Acker J. Platelet vesicles are potent inflammatory mediators in red blood cell products and washing reduces the inflammatory phenotype. *Transfusion*, 2019, Vol. 60, no. 2, pp. 378-390.
6. Apelseth T., Hervig T., Wentzel-Larsen T., Petersen K., Reikvam H., Bruserud O. A prospective observational study of the effect of platelet transfusions on levels of platelet-derived cytokines, chemokines and interleukins in acute leukaemia patients with severe chemotherapy-induced cytopenia. *Eur. Cytokine Netw.*, 2011, Vol. 22, no. 1, pp. 52-62.
7. Arraud N., Linares R., Tan S., Gounou C., Pasquet J.-M., Mornet S., Brisson A.R. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J. Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 12, no. 5, pp. 614-627.
8. Atzil S., Arad M., Glasner A., Abiri N., Avraham R., Greenfeld K., Rosenne E., Beilin B., Ben-Eliyahu S. Blood transfusion promotes cancer progression: a critical role for aged erythrocytes. *Anesthesiology*, 2008, Vol. 109, no. 6, pp. 989-997.
9. Baek J. H., Yalamanoglu A., Gao Y., Guenster R., Spahn D.R., Schaer D.J., Buehler P.W. Iron accelerates hemoglobin oxidation increasing mortality in vascular diseased guinea pigs following transfusion of stored blood. *JCI Insight*, 2017, Vol. 2, e93577. doi: 10.1172/jci.insight.93577.
10. Baumgartner J.M., Nydam T.L., Clarke J.H., Banerjee A., Silliman C.C., McCarter M.D. Red blood cell supernatant potentiates LPS-induced proinflammatory cytokine response from peripheral blood mononuclear cells. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2009, Vol. 29, no. 6, pp. 333-338.
11. Baumgartner J., Silliman C.C., Moore E.E., Banerjee A., McCarter M. Stored red blood cell transfusion induces regulatory T cells. *J. Am. Coll. Surg.*, 2009, Vol. 208, no. 1, pp. 110-119.

12. Belizaire R., Prakash P., Richter J., Robinson B.R., Edwards M.J., Caldwell C., Lentsch A., Pritts T.A. Microparticles from stored red blood cells activate neutrophils and cause lung injury after hemorrhage and resuscitation. *J. Am. Coll. Surg.*, 2012, Vol. 214, no. 4, pp. 648-655.
13. Blajchman M. Immunomodulation and blood transfusion. *Am. J. Ther.*, 2002, Vol. 9, no. 5, pp. 389-395.
14. Bury T., Corhay J., Radermecker M. Histamine-induced inhibition of neutrophil chemotaxis and T-lymphocyte proliferation in man. *Allergy*, 1992, Vol. 47, no. 6, pp. 624-629.
15. Caramalho I., Lopes-Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M., Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 197, no. 4, pp. 403-411.
16. Chen X., Yang J., Hu S., Nie H., Mao G., Chen H. Increased expression of CD86 and reduced production of IL-12 and IL-10 by monocyte-derived dendritic cells from allergic asthmatics and their effects on Th1- and Th2-type cytokine balance. *Respiration*, 2006, Vol. 73, no. 1, pp. 34-40.
17. Coutant F., Perrin-Cocon L., Agaue S., Delair T., André P., Lotteau V. Mature dendritic cell generation promoted by lysophosphatidylcholine. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 4, pp. 1688-1695.
18. Cross J., Bradbury R., Fulford A., Jallow A., Wegmüller R., Prentice A., Cerami C. Oral iron acutely elevates bacterial growth in human serum. *Sci. Rep.*, 2015, no. 5, 16670. doi: 10.1038/srep16670. doi: 10.1038/srep16670.
19. Danesh A., Inglis H., Jackman R., Wu S. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses *in vitro*. *Blood*, 2013, Vol. 123, no. 5, pp. 687-696.
20. Delobel J., Prudent M., Rubin O., Crettaz D., Tissot J.-D., Lion N. Subcellular fractionation of stored red blood cells reveals a compartment-based protein carbonylation evolution. *J. Proteom.*, 2012, Vol. 76, Spec. no., pp. 181-193.
21. Deeb A., Aquina C.T., Monson J., Blumberg N., Becerra A., Fleming F. Allogeneic leukocyte-reduced red blood cell transfusion is associated with postoperative infectious complications and cancer recurrence after colon cancer resection. *Dig Surg.*, 2020, Vol. 37, no. 2, pp. 163-170.
22. Dey-Hazra E., Hertel B., Kirsch T., Woywodt A., Lovric S., Haller H., Haubitz M., Erdbruegger U. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc. Health Risk Manag.*, 2010, Vol. 6, no. 6, pp. 1125-1133.
23. Dzik S., Murphy M. Emerging research in transfusion medicine: what to expect in 2020. *Transfus. Med. Rev.*, 2020, Vol. 34, no. 1, pp. 1-4.
24. Fernandez-Messina L., Gutierrez-Vazquez C., Rivas-Garcia E., Sánchez-Madri dF., de la Fuente H. Immunomodulatory role of microRNAs transferred by extracellular vesicles. *Biol. Cell*, 2015, Vol. 107, no. 3, pp. 61-77.
25. Fox L., Cox D., Lockridge J., Wang X., Chen X., Scharf L., Trott D., Ndonge R., Veerapen N., Besra G., Howell A., Cook M., Adams E., Hildebrand W., Gumperz J. Recognition of lysophospholipids by human natural killer T lymphocytes. *PLoS Biol.*, 2009, Vol. 7, no. 10, e1000228. doi: 10.1371/journal.pbio.1000228.
26. Ghio M., Contini P., Ubezio G., Ansaldi F., Setti M., Tripodi G. Blood transfusions with high levels of contaminating soluble HLA-I correlate with levels of soluble CD8 in recipients' plasma; a new control factor in soluble HLA-I-mediated transfusion-modulated immunomodulation? *Blood Transfus.*, 2014, Vol. 12, no. 1, pp. 105-108.
27. Ghio M., Contini P., Negrini S., Mazzei C., Zocchi M.R., Poggi A. Down regulation of human natural killer cell-mediated cytotoxicity induced by blood transfusion: role of transforming growth factor- β (1), soluble Fas ligand, and soluble Class I human leukocyte antigen. *Transfusion*, 2011, Vol. 51, no. 7, pp. 1567-1573.
28. Halpin A., Nahiriak S., Campbell P., Urschel S., Kim D., West L., Pidorchynski T., Buchholz H., Conway J. HLA alloimmunization following ventricular assist device support across the age spectrum. *Transplantation*, 2019, Vol. 103, no. 12, pp. 2715-2724.
29. Hassani H., Khoshdel H., Sharifzadeh S.R., Heydari M.F., Alizadeh S., Aghideh A.N. TNF- α and TGF- β level after intraoperative allogeneic red blood cell transfusion in orthopedic operation patients. *Turkish J. Med. Scien.*, 2017, Vol. 47, no. 6, pp. 1813-1818.
30. Hirani R., Balogh Z., Lott N., Hsu J., Irving D. Leukodepleted blood components do not remove the potential for long-term transfusion-associated microchimerism in Australian major trauma patients. *Chimerism*, 2014, Vol. 5, no. 3, pp. 86-93.
31. Hirani R., Dean M., Balogh Z., Lott N., Seggie J., Hsu J., Taggart S., Maitz P., Survela L., Joseph A., Gillett M., Irving D. Donor white blood cell survival and cytokine profiles following red blood cell transfusion in Australian major trauma patients. *Mol. Immunol.*, 2018, Vol. 103, pp. 229-234.
32. Holmes C., Levis J., Ornstein D. Activated platelets enhance ovarian cancer cell invasion in a cellular model of metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*, 2009, Vol. 26, no. 7, pp. 653-661.
33. Hood M., Skaar E. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2012, Vol. 10, no. 8, pp. 525-537.
34. Hunsicker O., Gericke S., Graw J., Krannich A., Boemke W., Meyer O., Braicu I., Spies C., Sehoul J., Pruß A., Feldheiser A. Transfusion of red blood cells does not impact progression-free and overall survival after surgery for ovarian cancer. *Transfusion*, 2019, Vol. 59, no. 12, pp. 3589-3600.
35. Jacobi K., Wanke C., Jacobi A., Weisbach V., Hemmerling T. Determination of eicosanoid and cytokine production in salvaged blood, stored red blood cell concentrates, and whole blood. *J. Clin. Anesth.*, 2000, Vol. 12, no. 9, pp. 94-99.
36. Jiao C., Zheng L. Blood transfusion-related immunomodulation in patients with major obstetric haemorrhage. *Vox Sanguinis*, 2019, Vol. 114, no. 8, pp. 861-868.
37. Jin Y., Damaj B., Maghazachi A. Human resting CD162, CD16⁺ and IL-2⁻, IL-12⁻, IL-15⁻ or IFN- α -activated natural killer cells differentially respond to sphingosylphosphorylcholine, lysophosphatidylcholine and platelet-activating factor. *Eur. J. Immunol.*, 2005, Vol. 35, no. 9, pp. 2699-2708.
38. Kanter J., Khan S., Kelher M., Gore L., Silliman C. Oncogenic and angiogenic growth factors accumulate during routine storage of apheresis platelet concentrates. *Clin. Cancer Res.*, 2008, Vol. 14, no. 12, pp. 3942-3947.

39. Karam O., Tucci M., Toledano B., Robitaille N., Cousineau J., Thibault L., Lacroix J., Le Deist F. Length of storage and *in vitro* immunomodulation induced by prestorage leukoreduced red blood cells. *Transfusion*, 2009, Vol. 49, no. 11, pp. 2326-2334.
40. Keir A., McPhee A., Andersen C., Stark M. Plasma cytokines and markers of endothelial activation increase after packed red blood cell transfusion in the preterm infant. *Pediatr. Res.*, 2013, Vol. 73, no. 1, pp. 75-79.
41. Ki K.K., Johnson L., Faddy H.M., Flower R. L. Marks D.C., Dean M.M. Immunomodulatory effect of cryopreserved platelets: altered BDCA31 dendritic cell maturation and activation *in vitro*. *Transfusion*, 2017, Vol. 57, no. 12, pp. 2878-2887.
42. Lamiaa M., Hala Y., Hala A., Hawary R., Selim A., Aly S., Nada M., Aly H. Effect of packed red blood cell transfusion on IL-8 and sICAM-1 in premature neonates at different postnatal ages. *Pediatr. Neonatol.*, 2019, Vol. 60, no. 5, pp. 537-542.
43. Lange M.M., van Hilten J.A., van de Watering L.M., Bijnen B.A., Roumen R.M., Putter H., Brand A., van de Velde C.J. Leucocyte depletion of perioperative blood transfusion does not affect long-term survival and recurrence in patients with gastrointestinal cancer. *Br. J. Surg.*, 2009, Vol. 96, no. 7, pp. 734-740.
44. Lapierre V., Aupérin A., Robinet E., Ferrand C., Oubouzar N., Tramalloni D., Saas P., Debaene B., Lasser P., Tiberghien P. Immune modulation and microchimerism after unmodified versus leukoreduced allogeneic red blood cell transfusion in cancer patients: results of a randomized study. *Transfusion*, 2007, Vol. 47, no. 9, pp. 1691-1699.
45. Luo L., Wang D., Chen M., Li M. Effects of reinfusion of the remaining blood filtered by leukocyte depletion filter on postoperative cellular immune function after cardiopulmonary bypass. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2019, Vol. 31, no. 8, pp. 989-993.
46. Mathivanan S., Ji H., Simpson R. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteom.*, 2010, Vol. 73, no. 10, pp. 1907-1920.
47. Matsubayashi H., Weidner J., Miraglia C., McIntyre J. Platelet membrane early activation markers during prolonged storage. *Thromb. Res.*, 1999, Vol. 93, no. 4, pp. 151-160.
48. Mittal S., Cho K., Ishido S., Roche P.A. Interleukin 10 (IL-10)-mediated Immunosuppression: MARCH-I induction regulates antigen presentation by macrophages but not dendritic cells. *J. Biol. Chem.*, 2015, Vol. 290, no. 45, pp. 27158-27167.
49. Mulligan J., Rosenzweig S., Young M. Tumor secretion of VEGF induces endothelial cells to suppress T cell functions through the production of PGE2. *J. Immunother.*, 2010, Vol. 33, no. 2, pp. 126-135.
50. Muszynski J., Bale J., Nateri J., Nicol K. Supernatants from stored red blood cell (RBC) units, but not RBC-derived microvesicles, suppress monocyte function *in vitro*. *Transfusion*, 2015, Vol. 55, no. 8, pp. 1937-1945.
51. Muszynski J., Spinella P., Cholette J., Acker J., Hall M., Juffermans N., Kelly D., Blumberg N., Nicol K., Liedel J., Doctor A., Remy K., Tucci M., Lacroix J., Norris P. Transfusion-related immunomodulation: review of the literature and implications for pediatric critical illness. *Transfusion*, 2017, Vol. 57, no. 1, pp. 195-206.
52. Nagura Y., Tsuno N., Tanaka M., Matsushashi M., Takahashi K. The effect of prestorage whole-blood leukocyte reduction on cytokines/chemokines levels in autologous CPDA-1 whole blood. *Transfus. Apher. Sci.*, 2013, Vol. 49, no. 2, pp. 223-230.
53. Nelson K.A., Aldea G.S., Warner P., Latchman Y., Gunasekera D., Tamir A., Gernsheimer T., Bolgiano D., Slichter S.J. Transfusion-related immunomodulation: gamma irradiation alters the effects of leukoreduction on alloimmunization. *Transfusion*, 2019, Vol. 59, no. 11, pp. 3396-3404.
54. Olofsson K.E., Andersson L., Nilsson J., Björkbacka H. Nanomolar concentrations of lysophosphatidylcholine recruit monocytes and induce pro-inflammatory cytokine production in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, Vol. 370, no. 2, pp. 348-352.
55. Ozment C.P., Mamo L.B., Campbell M.L., Lokhnygina Y., Ghio A., Turi J. Transfusion-related biologic effects and free hemoglobin, heme, and iron. *Transfusion*, 2013, Vol. 53, no. 4, pp. 732-740.
56. Patel M.B., Proctor K.G., Majetschak M. Extracellular ubiquitin increases in packed red blood cell units during storage. *J. Surg. Res.*, 2006, Vol. 135, no. 2, pp. 226-232.
57. Petri B., Phillipson M., Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an *in vivo* perspective. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 10, pp. 6439-6436.
58. Remy K., Natanson C., Klein H.G. The influence of the storage lesion(s) on pediatric red cell transfusion. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2015, Vol. 27, no. 3, pp. 277-285.
59. Ren Y., Lin C., Li Z., Chen X.Y. Up-regulation of macrophage migration inhibitory factor in infants with acute neonatal necrotizing enterocolitis. *Histopathology*, 2005, Vol. 46, no. 6, pp. 659-667.
60. Robinson D. The role of regulatory T lymphocytes in asthma pathogenesis. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2005, Vol. 5, no. 2, pp. 136-141.
61. Saas P., Angelot F., Bardiaux L., Seillès E., Garnache-Ottou F., Perruche S. Phosphatidylserine-expressing cell by-products in transfusion: a pro-inflammatory or an anti-inflammatory effect? *Transfus. Clin. Biol.*, 2012, Vol. 19, no. 3, pp. 90-97.
62. Sadallah S., Eken C., Martin P., Schifferli J. Microparticles (ectosomes) shed by stored human platelets downregulate macrophages and modify the development of dendritic cells. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 11, pp. 6543-6552.
63. Saris A., Kerkhoffs J.L., Norris P.J., van Ham M., Brinke A., Brand A., van der Meer P. F., Zwaginga J.J. The role of pathogen-reduced platelet transfusions on HLA alloimmunization in hemato-oncological patients. *Transfusion*, 2019, Vol. 59, no. 2, pp. 470-481.
64. Silliman C., Clay K., Thurman G., Johnson C., Ambruso D. Partial characterization of lipids that develop during the routine storage of blood and prime the neutrophil NADPH oxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 1994, Vol. 124, no. 5, pp. 684-694.
65. Seghatchian J. Platelet storage lesion: an update on the impact of various leukoreduction processes on the biological response modifiers. *Transfus. Apher. Sci.*, 2006, Vol. 34, no. 1, pp. 125-130.

66. Soontrapa K., Honda T., Sakata D., Yao C., Hirata T., Hori S., Matsuoka T., Kita Y., Shimizu T., Kabashima K., Narumiya S. Prostaglandin E2-prostaglandin E receptor subtype 4 (EP4) signaling mediates UV irradiation-induced systemic immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, Vol. 108, no. 16, pp. 6668-6673.
67. Suksompong S., Tassaneeritthep B., Ariyawatkul T., Sirivanasandha B. Allogeneic red cell transfusion and its influence on relevant humoral and cellular immunological parameters: A prospective observational trial. *Eur. J. Anaesthesiol.*, 2019, Vol. 36, no. 11, pp. 814-824.
68. Tetta C., Ghigo E., Silengo L., Deregibus M.C., Camussi G. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine*, 2013, Vol. 44, no. 1, pp. 11-19.
69. Vlaar A., Hofstra J., Kulik W., van Lenthe H., Nieuwland R., Schultz M., Levi M., Roelofs J., Tool A., de Korte D., Juffermans N. Supernatant of stored platelets causes lung inflammation and coagulopathy in a novel *in vivo* transfusion model. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 8, pp. 1360-1368.
70. Vallion R., Bonnefoy F., Daoui A., Vieille L., Tiberghien P., Saas P., Perruche S. Transforming growth factor- β released by apoptotic white blood cells during red blood cell storage promotes transfusion-induced alloimmunomodulation. *Transfusion*, 2015, Vol. 55, no. 7, pp. 1721-1735.
71. van Hilten J., van de Wetering L., van Bockel J., van de Velde C., Kievit J., Brand R., van Den Hout W., Geelkerken R., Roumen R., Wesselink R., Koopman-van Gemert A., Koning J., Brand A. Effects of transfusion with red cells filtered to remove leucocytes: randomised controlled trial in patients undergoing major surgery. *BMJ*, 2004, Vol. 328, no. 451, 1281. doi: 10.1136/bmj.38103.735266.55.
72. Walker E., Walker S. Effects of iron overload on the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2000, Vol. 30, no. 4, pp. 354-365.
73. Wang D., Cortes-Puch I., Sun J., Solomon S., Kanas T., Remy K., Feng J., Alimchandani M., Quezada M., Helms C., Perlegas A., Gladwin M., Kim-Shapiro D., Klein H., Natanson H. Transfusion of older stored blood worsens outcomes in canines depending on the presence and severity of pneumonia. *Transfusion*, 2014, Vol. 54, no. 7, pp. 1712-1724.
74. Xiong Z., Cavaretta J., Qu L., Stolz D.B., Triulzi D., Lee J. Red blood cell microparticles show altered inflammatory chemokine binding and release ligand upon interaction with platelets. *Transfusion*, 2011, Vol. 51, no. 3, pp. 610-621.
75. Yamamoto S., Niida S., Azuma E., Yanagibashi T., Muramatsu M., Huang T.T., Sagara H., Higaki S., Ikutani M., Nagai Y., Takatsu K., Miyazaki K., Hamashima T., Mori H., Matsuda N., Ishii Y., Sasahara M. Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. *Sci Rep.*, 2015, Vol. 5, 8505. doi: 10.1038/srep08505.
76. Zhang B., Yin Y., Lai R., Lim S. Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 518. doi: 10.3389/fimmu.2014.00518.
77. Zhu X., Yu B., You P., Wua Y., Fanga Y., Yanga L., Xiaa R. Ubiquitin released in the plasma of whole blood during storage promotes mRNA expression of Th2 cytokines and Th2-inducing transcription factors. *Transfus. Apher. Sci.*, 2012, Vol. 47, no. 3, pp. 305-311.

Авторы:

Глазанова Т.В. — д.м.н., руководитель лаборатории иммуногематологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Шилова Е.Р. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммуногематологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Чечеткин А.В. — д.м.н., профессор, заместитель директора ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Бубнова Л.Н. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель Республиканского центра иммунологического типирования тканей ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Glazanova T.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Immunohaematology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Shilova E.R., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Immunohaematology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Chechetkin A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Bubnova L.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Researcher of Russia, Head, Russian Center of Tissues Typing, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 07.06.2021
Принята к печати 20.10.2021

Received 07.06.2021
Accepted 20.10.2021

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА Т-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ АНКИЛОЗИРУЮЩИМ СПОНДИЛИТОМ НА ФОНЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Савченко А.А.^{1,2}, Гриценко О.Д.², Борисов А.Г.^{1,2}, Кудрявцев И.В.^{3,4},
Серебрякова М.К.³, Мастерова А.А.², Шестерня П.А.²

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

³ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Целью исследования явилось сравнительное изучение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов у больных анкилозирующим спондилитом (АС), получающих различные виды генно-инженерной биологической терапии (ГИБТ). Обследовано 58 пациентов в возрасте 20-58 лет с диагнозом АС на фоне лечения анти-TNF α и анти-IL-17 препаратами, а также получавших традиционную противовоспалительную терапию. Диагноз «АС» устанавливался на основании модифицированных Нью-Йоркских критериев. Активность заболевания оценивалась с помощью индексов BASDAI и ASDAS с использованием СОЭ и СРБ согласно текущей номенклатуре, утвержденной Assessment of SpondyloArthritis International Society и Outcome Measures in Rheumatology. В качестве контроля обследовано 45 здоровых людей в возрасте 18-57 лет. Исследование фенотипического состава Т-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови. Установлено, что субпопуляционный состав Т-лимфоцитов у больных АС значительно различается в зависимости от типа проводимой терапии. У больных АС на фоне традиционной противовоспалительной терапии в крови снижается содержание Т-лимфоцитов, но при повышении относительного количества Т-клеток с высоким уровнем эффекторного потенциала и секреции цитокинов. Отрицательные взаимосвязи уровней цитотоксических Т-клеток эффекторной памяти и пре-эффекторов с лабораторными и клиническими показателями активности воспаления при АС характеризуют недостаточную эффективность традиционной тера-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-29-29.
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) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Савченко, О.Д. Гриценко, А.Г. Борисов,
И.В. Кудрявцев, М.К. Серебрякова, А.А. Мастерова,
П.А. Шестерня «Особенности субпопуляционного
состава Т-лимфоцитов у больных анкилозирующим
спондилитом на фоне генно-инженерной биологической
терапии» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23,
№ 6. С. 1319-1332. doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2349
© Савченко А.А. и соавт., 2021

For citation:

A.A. Savchenko, O.D. Gritsenko, A.G. Borisov,
I.V. Kudryavtsev, M.K. Serebriakova, A.A. Masterova,
P.A. Shesternya "Features of T lymphocyte subpopulation
profile in patients with ankylosing spondylitis undergoing
genetically engineered biological therapy", Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021,
Vol. 23, no. 6, pp. 1319-1332.
doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2349
DOI: 10.15789/1563-0625-FOT-2349

пии. Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов у больных АС на фоне анти-IL-17 терапии полностью соответствует контрольным значениям. Однако, исходя из многочисленных взаимосвязей между иммунологическими и клинико-лабораторными показателями, сделано заключение об ингибирующем влиянии анти-IL-17 терапии на активность суставного воспаления, тогда как состояние субпопуляционного состава Т-клеток будет зависеть от стандартных средств противовоспалительной терапии. Наиболее выраженные изменения в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов обнаружены у больных АС при анти-TNF α терапии, что проявляется в снижении эффекторного потенциала Th-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов. При этом, у больных АС именно на фоне анти-TNF α терапии обнаружена минимальная частота внескелетных проявлений. Соответственно, более высокая эффективность ГИБТ (по сравнению с традиционными методами терапии) определяется механизмами воздействия на иммунные мишени патогенеза АС, что проявляется, в том числе, изменением субпопуляционного состава Т-лимфоцитов. Причем, исходя из полученных результатов, применение анти-TNF α в сравнении с ингибиторами анти-IL-17 в большей степени оказывает влияние на фенотипический состав Т-клеток.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, больные анкилозирующим спондилитом, субпопуляции лимфоцитов, фенотип, Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты

FEATURES OF T LYMPHOCYTE SUBPOPULATION PROFILE IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS UNDERGOING GENETICALLY ENGINEERED BIOLOGICAL THERAPY

Savchenko A.A.^{a, b}, Gritsenko O.D.^b, Borisov A.G.^{a, b}, Kudryavtsev I.V.^{c, d}, Serebriakova M.K.^c, Masterova A.A.^b, Shesternya P.A.^b

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

^b Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

Abstract. The aim of current study was to compare profiles of T cell subsets in the patients with ankylosing spondylitis (AS) who received different modes of genetically engineered biological therapy (GEBT). The research involved 58 patients aged 20 to 58 years diagnosed with AS and treated with anti-TNF α and anti-IL-17 drugs, as well as those receiving common anti-inflammatory therapy. The AS diagnostics was based on the modified New York criteria. Disease activity was assessed by means of nomenclature approved by the Assessment of Spondyloarthritis International Society and Outcome Measures in Rheumatology. 45 healthy people aged 18 to 57 were included into the control group. Peripheral blood T cell subsets were analysed by multicolor flow cytometry. It was found that the T lymphocyte subpopulation profiles in AS patients showed significant differences depending on the therapy type. First, T lymphocyte counts were decreased in AS patients receiving traditional anti-inflammatory therapy, whereas relative numbers of T cells with high levels of effector potential and cytokine secretion were increased. Negative correlations between the levels of effector memory and pre-effector cytotoxic T cells and other laboratory and clinical indexes of inflammatory activity in AS may reflect lower efficiency of traditional therapy. Next, the levels of main T cell subsets in AS patients during anti-IL-17 therapy fully corresponded to the control values. However, based on numerous correlations between immunological and clinical laboratory parameters, it was concluded that anti-IL-17 therapy had an inhibitory effect on the joint inflammation activity, while the state of T cell subsets was mainly dependent on standard anti-inflammatory therapy. The most pronounced changes in T cell subsets were found in AS patients during

anti-TNF α therapy was associated with decreased effector potential of Th cells and cytotoxic T lymphocytes. At the same time, the lowest frequency of extrasketal manifestations was found in AS patients treated with anti-TNF α drugs. Finally, the higher efficiency of GEBT, compared with conventional methods of therapy, is determined by the effects upon immune targets of AS pathogenesis which manifested, e.g., by changes in the T lymphocyte subpopulation profile. Moreover, usage of anti-TNF α *versus* anti-IL-17 inhibitors was associated with greater effect upon phenotypic profile of T cells.

Keywords: ankylosing spondylitis, T cells, subsets, phenotype, T helpers, cytotoxic T cells

Введение

Анкилозирующий спондилит (АС) — системное воспалительное заболевание, характеризующееся поражением крестцово-подвздошных суставов и/или позвоночника, которое может развиваться с одновременным поражением энтезиса и периферических суставов [1, 9, 28]. Полностью патогенез АС еще не изучен, однако доказано, что генетическая предрасположенность (ассоциация с HLA-B27) и активация иммунной системы, в настоящее время, определяются как ключевые патологические процессы, инициирующие развитие данного заболевания [7, 12]. Ведущим механизмом активации иммунной системы (как врожденного, так и адаптивного иммунитета) при АС является регулирующая ось IL-23/IL-17, стимулирующая эффекторные клетки к избыточной продукции TNF α и, соответственно, воспалительного процесса в суставах [7, 8, 15, 18].

Ключевыми клетками, регулирующими активность иммунной системы, являются Т-лимфоциты. Соответственно, ряд исследований посвящено изучению особенностей фенотипа и функциональной активности некоторых субпопуляций Т-клеток. Так, в исследовании Al-Mossawi М.Н. и соавт. (2017) показано увеличение количества Th1- и Th17-клеток в крови у больных АС, причем данные типы клеток активно секретируют GM-CSF, также участвующий в иммунопатогенезе АС [11]. Причем ингибирование функциональной активности Th17-лимфоцитов у больных АС приводило к снижению воспалительной реакции и проявлению клинических признаков заболевания [15]. При АС обнаружена функциональная недостаточность Т-регуляторных клеток (Treg) [10, 24]. Индуцированное повышение активности Treg вызывало снижение функциональной активности Th17-клеток с последующим понижением концентрации IL-17 [38].

В начале XXI века в лечении АС произошли революционные изменения, связанные с внедрением в клиническую практику генно-инженерной биологической терапии (ГИБТ) — препаратов, воздействующих на «контрольные точки» имму-

нопатогенеза АС [1, 8, 13]. В настоящее время одобрены к применению у больных АС лекарственные препараты моноклональных антител к TNF α (анти-TNF α) и IL-17 (анти-IL-17) [2, 7, 23, 27]. В обзоре Tahir Н. и соавт. (2020) показано, что при лечении анти-IL-17 больных с АС развивалась быстрая и устойчивая ремиссия (до 5 лет последующих наблюдений), положительный эффект был достигнут независимо от предыдущих методов терапии, но зависел от уровня исходного воспалительного процесса (меньший эффект развивался при высоком уровне воспаления) [33]. При лечении препаратами анти-TNF α уже на 3-м месяце была достигнута клиническая ремиссия, ее продолжительность зависела от выраженности клинических улучшений на начальной стадии лечения [27].

В целом можно заключить, что применение ГИБТ при лечении АС оказывается более эффективно по сравнению с традиционными методами терапии, но во многом зависит от состояния иммуновоспалительных процессов, которое, в свою очередь, определяется функциональной активностью клеток иммунной системы. Выявление предикторов эффективности применения различных методов ГИБТ при АС является крайне актуальным. Так, в работе Maneiro J.R. и соавт. (2015) показано, что в качестве предикторов эффективности лечения ингибиторами TNF α могут быть использованы величины индексов BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index), базальный уровень С-реактивного белка (СРБ) и возраст пациента [23]. Совершенно очевидно, что данные параметры отражают активность заболевания, что ограничивает их клиническую имплементацию. Разрабатываются технологии прогноза эффективности ГИБТ и на основе нейросетевого анализа с использованием массива данных, включающих клинические и иммунологические показатели [18]. Ограничением подобных инструментов является громоздкость и сложность использования на практике. Необходим поиск более простых и надежных предикторов. Одним из перспективных подходов является изучение количественных изменений циркули-

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ АС НА ФОНЕ ГИБТ

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF AS PATIENTS DURING GEBT

Показатели Parameters	Без ГИБТ WGEBT n = 19	анти-IL-17 anti-IL-17A n = 15	анти-TNF α anti-TNF α n = 24	p ₁₋₂	p ₂₋₃	p ₁₋₃
Возраст (лет), Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Age (years), Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	37 (30-48)	40 (31-49)	41 (33-45)	0,758	0,943	0,672
Пол, n (%) Женщины / Мужчины Gender, n (%) Female / Male	4 (21,1) / 15 (78,9)	5 (33,3) / 10 (66,7)	5 (20,8) / 19 (79,2)	0,462	0,463	1,000
HLA-B27*, n (%)	17 (89,5)	12 (80,0)	20 (83,3)	0,634	1,000	0,678
Наличие внескелетных проявлений, n (%) Presence of extraskeletal manifestations, n (%)	16 (84,2)	10 (66,7)	12 (50,0)	0,418	0,343	0,026
BASDAI, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	1,00 (1,00-3,00)	1,60 (1,00-3,20)	2,05 (1,50-3,95)	0,583	0,296	0,089
ASDAS-CRP, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	1,40 (1,20-2,00)	1,50 (1,00-2,60)	1,85 (1,35-2,65)	0,607	0,368	0,161
BASFI, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	1,00 (0,00-3,00)	2,20 (1,00-3,80)	2,95 (1,30-3,95)	0,043	0,658	0,007
BASFI > 4, n (%)	2 (10,5)	3 (20,0)	5 (20,8)	0,634	1,000	0,437
Лейкоциты, 10 ⁹ /л, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Leukocytes, 10 ⁹ /L, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	7,21 (5,81-9,73)	7,28 (6,26-10,68)	7,72 (6,46-8,28)	0,632	0,856	0,970
Тромбоциты, 10 ⁹ /л, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Platelets, 10 ⁹ /L, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	296,00 (237,00-318,00)	263,00 (224,00-325,00)	267,00 (238,00-347,00)	0,758	0,821	0,677
Эритроциты, 10 ¹² /л, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Erythrocytes, 10 ¹² /L, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	4,88 (4,53-5,13)	4,82 (4,44-5,04)	4,76 (4,23-5,44)	0,354	0,717	0,734
Гемоглобин, г/л, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Hemoglobin, g/L, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	14,20 (13,80-15,20)	14,10 (12,70-15,20)	13,90 (13,20-15,90)	0,471	0,496	0,734
СРБ, мг/л, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) CRP, mg/L, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	3,70 (0,70-11,00)	3,00 (2,10-4,40)	2,20 (1,35-9,25)	0,784	0,399	0,913
СОЭ, мм/час, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) ESR, mm/hour, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	6,0 (3,0-10,0)	6,0 (5,0-16,0)	5,0 (4,0-9,0)	0,336	0,440	0,910

Примечание. p₁₋₂ – сравнение между группами пациентов с АС на фоне традиционного лечения (без ГИБТ) и терапией анти-IL-17R; p₁₋₃ – сравнение между группами пациентов с АС без ГИБТ и терапией анти-TNF α ; p₂₋₃ – сравнение между группами АС пациенты с терапией анти-IL-17R и терапией против TNF α .

Note. p₁₋₂, comparison between groups of AS patients with traditional therapy (WGEBT) and anti-IL-17R therapy; p₁₋₃, comparison between groups of AS patients with WGEBT and anti-TNF α therapy; p₂₋₃, comparison between groups of AS patients with anti-IL-17R therapy and anti-TNF α therapy.

рующих субпопуляций Т-лимфоцитов, происходящих на фоне ГИБТ.

Целью исследования явилось сравнительное изучение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов у больных АС, получающих различные виды ГИБТ.

Материалы и методы

Исследование проводилось в Красноярском государственном медицинском университете им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого в 2019–2020 гг. в рамках Государственного задания Министерства здравоохранения РФ «Персонализированная клиничко-иммунологическая стратегия генно-инженерной биологической терапии спондилоартрита» (№ АААА-А20-120022890005-5). Исследование одобрено локальным этическим комитетом, все пациенты подписывали форму информированного согласия. В исследование было включено 58 пациентов (14 женщин и 44 мужчин) в возрасте 20–58 лет ($M = 40,0$ лет ($32,0-47,0$)) с диагнозом «АС». Диагноз «АС» устанавливался на основании модифицированных Нью-Йоркских критериев [34]. Критериями исключения были другие заболевания группы спондилоартритов, остеоартрит, острые и хронические заболевания в стадии обострения, заболевания крови и онкологические заболевания. Активность заболевания оценивалась с помощью индексов BASDAI и ASDAS (Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score) с использованием СОЭ и СРБ согласно текущей номенклатуре, утвержденной Assessment of SpondyloArthritis International Society и Outcome Measures in Rheumatology – ASAS/OMERACT [22]. Клиничко-лабораторная характеристика обследованных больных АС, получавших различные виды терапии представлена в таблице 1. 24 больных АС получали анти-TNF α (адалимумаб – 6 пациентов, инфликсимаб – 14, этанерцепт – 3, голимумаб – 1) и 15 больных получали анти-IL-17 (секукинумаб – 8 пациентов, нетакимаб – 7). Все препараты использовались в рекомендованных дозировках и кратности введений, длительность ГИБТ составила 1,5 (1,0–4,5) года. В группе пациентов, получавших традиционную терапию, использовались нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) – 19 пациентов (100%), глюкокортикоиды – 13 (68,4%), сульфасалазин – 7 (36,8%), метотрексат – 3 (15,8%). В качестве контроля обследовано 45 здоровых людей (15 женщин и 30 мужчин) в возрасте 18–57 лет ($M = 39,0$ лет ($27,0-47,0$)).

Исследование субпопуляционного состава Т-лимфоцитов не позднее 24 часов после взятия

крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями производителей антител. Для выявления основных популяций Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов применялась следующая панель моноклональных антител (МАТ), конъюгированных с различными флуорохромами (все антитела производства Beckman Coulter, США): CD62L-ECD (клон DREG56, кат. № IM2713U), CD28-PC5 (клон CD28.2, кат. № 6607108), CD27-PC7 (клон 1A4CD27, кат. № A54823), CD4-APC (клон 13B8.2 кат. № IM2468), CD8-APC-Alexa Fluor 700 (клон B9.11, кат. № A66332), CD3-APC-Alexa Fluor 750 (клон UCHT1, кат. № A94680), CD45RA-PacBlue (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4), кат. № A82946) и CD45-Krome Orange (клон J.33, кат. № A96416). Указанным коктейлем МАТ окрашивали 100 мкл периферической крови в соответствии с рекомендациями производителя. Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse (кат. № A09777), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800). Абсолютные значения были получены с помощью реагента Flow-Count Fluorospheres (кат. № 7547053, Beckman Coulter, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США) Центра коллективного пользования КНЦ СО РАН, оснащенный тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Для выявления основных популяций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток использовали алгоритм, детально описанный ранее [6]. В каждой пробе анализировали не менее 50000 лимфоцитов. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v. 1.2 и Kaluza™ v. 2.2 (Beckman Coulter, США).

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (M) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$). Качественные переменные клинических показателей были представлены в абсолютных значениях и процентах (n (%)). Достоверность различий количественных показателей оценивали с помощью непараметрического критерия U-критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Сравнение качественных переменных проводилось с использованием точного критерия Фишера (Fisher's exact test). Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену (Spearman rank R). Статистический анализ осуществляли в пакете

ТАБЛИЦА 2. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ АС НА ФОНЕ ГИБТ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. COMPOSITION OF T LYMPHOCYTE SUBSET IN AS PATIENTS DURING GEFT, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Контроль Control n = 45	Больные АС AS patients		
		Без ГИБТ WGEFT n = 19	анти-IL-17 anti-IL-17 n = 15	анти-TNF α anti-TNF α n = 24
CD3 ⁺ , %	78,5 (73,8-80,8)	73,5 (57,8-79,3) $p_1 = 0,039$	75,2 (66,1-78,6)	74,5 (71,1-78,0)
CD3 ⁺ , cells/ μ L	1268,34 (1089,94-1580,26)	1251,25 (1024,84-1620,89)	1526,30 (1113,23-1825,17)	1716,76 (1444,53-2310,06) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,002$
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	47,8 (44,9-52,7)	47,3 (39,1-50,0)	42,9 (40,0-54,3)	48,4 (41,2-51,6)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , cells/ μ L	775,68 (676,00-1053,23)	753,29 (641,65-1056,72)	974,08 (624,94-1217,71)	1146,16 (833,02-1431,88) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,001$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	24,9 (21,0-29,6)	21,7 (20,8-29,7)	23,2 (19,1-28,0)	21,2 (20,1-25,1)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , cells/ μ L	443,42 (351,46-524,70)	475,70 (271,49-563,80)	449,46 (375,69-573,69)	508,74 (393,72-666,67) $p_1 = 0,023$
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,98 (1,66-2,31)	2,06 (1,47-2,45)	2,11 (1,63-2,45)	2,32 (1,63-2,45)

Примечание. p_1 – статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p_2 – -/- больных АС на фоне традиционного лечения (без ГИБТ).

Note. p_1 , statistically significant differences versus controls; p_2 , statistically significant differences versus AS patients during WGEFT.

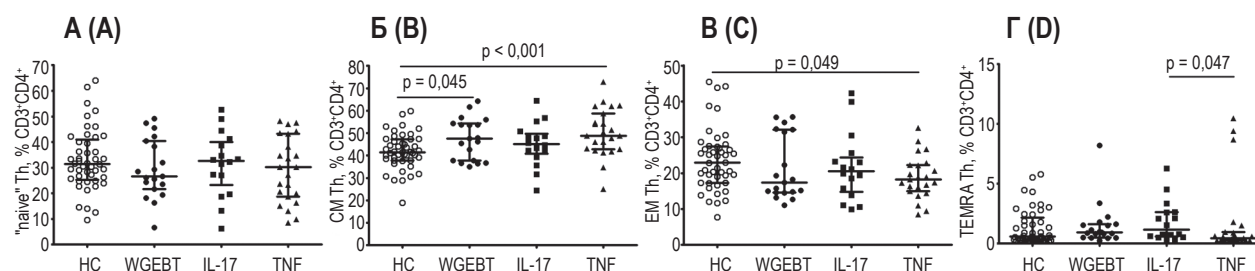


Рисунок 1. Распределение CD4⁺Т-лимфоцитов периферической крови на основные стадии созревания у больных АС на фоне ГИБТ

Примечание. Гистограммы А-Г – относительное содержание «наивных» CD45RA⁺CD62L⁺Т-хелперов, Т-хелперов центральной и эффекторной памяти (с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁺CD62L⁻ соответственно), а также CD45RA⁺CD62L⁻ эффекторных клеток соответственно.

Здесь и на рисунке 2: белые круги – группа контроля (НС, n = 45); черные круги – больных АС на фоне традиционного лечения, без применения терапии генно-инженерными биологическими препаратами (WGEFT, n = 19); черные квадраты – больные АС на фоне блокады IL-17 (IL-17, n = 15); черные треугольники – больные АС на фоне блокады TNF (TNF, n = 24). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)). Различия между сравниваемыми группами указаны согласно непараметрическому критерию Манна-Уитни.

Figure 1. Distribution of peripheral blood CD4⁺T lymphocytes at the main stages of maturation in AS patients undergoing GEFT

Note. Histograms A-D – relative number of “naïve” CD45RA⁺CD62L⁺T helpers, T helpers of central and effector memory (with the phenotypes of CD45RA⁺CD62L⁺ and CD45RA⁺CD62L⁻, respectively), as well as CD45RA⁺CD62L⁻ effector cells, respectively.

Here and in Figure 2: white circles – control group (HC, n = 45); black circles – AC patients undergoing traditional treatment without the use of therapy with genetically engineered biological drugs (WGEFT, n = 19); black squares – AC patients with IL-17 blockade (IL-17, n = 15); black triangles – AC patients with TNF blockade (TNF, n = 24). Results are presented as median and interquartile range (Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)). Differences between the compared groups are indicated according to the nonparametric Mann-Whitney U test.

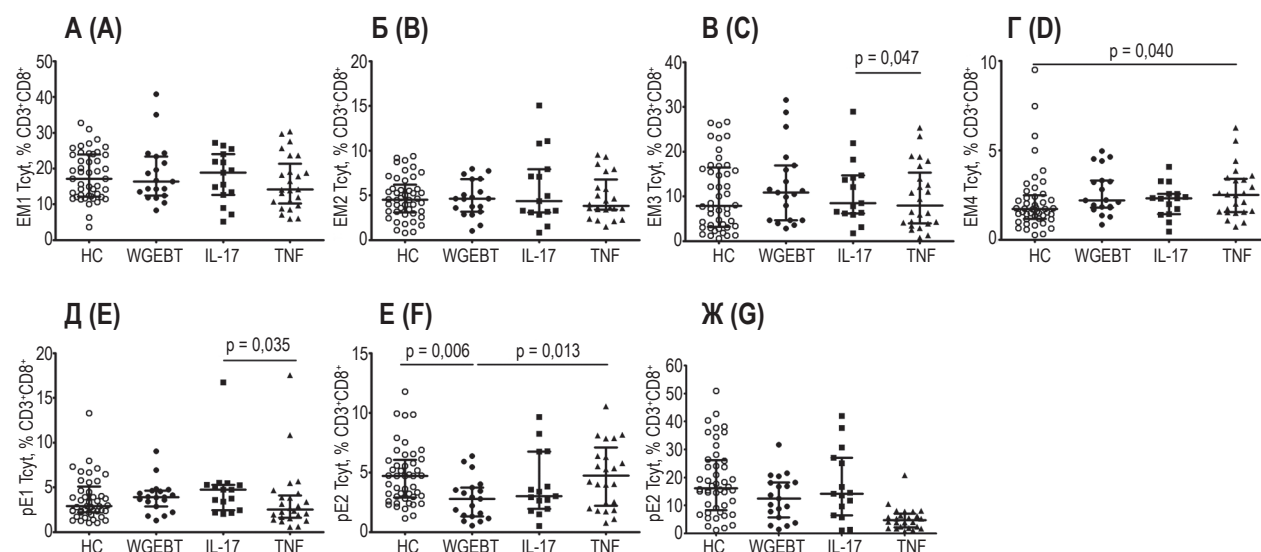


Рисунок 2. Распределение EM и TEMRA CD8⁺Т-лимфоцитов периферической крови на основные стадии созревания у больных АС на фоне ГИБТ

Примечание. Гистограммы А-Г – относительное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов эффекторной памяти популяций EM1-EM4 с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺, CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺, CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺ и CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺ соответственно. Гистограммы Д-Ж – относительное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов популяции TEMRA – пре-эффекторов 1-го типа (pE1 CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺), пре-эффекторов 2-го типа (pE2, CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺) и эффекторных клеток (E, CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺) соответственно.

Figure 2. Distribution of peripheral blood EM and TEMRA CD8⁺T lymphocytes at the main stages of maturation in AS patients undergoing GEBT

Note. Histograms A-D – relative number of cytotoxic T lymphocytes of the effector memory of the EM1-EM4 populations with the phenotypes of CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺, CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺, CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺ and CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺, respectively. Histograms E-G – relative number of cytotoxic T lymphocytes of the TEMRA population – type 1 “pre-effectors” (pE1 CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺), type 2 “pre-effectors” (pE2 CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺) and effector cells (E, CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺), respectively.

прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

При оценке клинического состояния больных АС обнаружено, что на фоне лечения анти-TNFα у обследованных пациентов относительно группы больных с традиционным лечением снижается частота внескелетных проявлений (табл. 1). Остальные параметры клинических и лабораторных показателей у больных, получавших ГИБТ или традиционную терапию (без ГИБТ), не различались.

При исследовании субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в крови у больных АС на фоне ГИБТ обнаружено, что наиболее выраженные изменения в содержании CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток выявляются при лечении анти-TNFα (табл. 2). Только у больных данной группы в периферической крови на фоне повышения абсолютного количества CD3⁺ лимфоцитов увеличивается абсолютное содержание CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток. На фоне традиционного лечения обнаружено снижение относительного

уровня CD3⁺ лимфоцитов, тогда как при лечении анти-IL-17 изменений в количестве CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток в крови не обнаружено.

В ходе дальнейших исследований был проведен анализ состава CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в зависимости от стадии дифференцировки у больных АС на фоне ГИБТ. Обнаружено, что содержание наивных Т-хелперов (“naïve” Th, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺) у больных АС на фоне традиционной терапии и ГИБТ соответствует контрольному диапазону (рис. 1А). Вместе с тем у пациентов с АС на фоне традиционной терапии в составе Т-хелперов относительно контрольных значений повышается содержание клеток центральной памяти (СМ, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺) (рис. 1Б). При лечении анти-TNFα также выявляется увеличение количества СМ Th-клеток, но при снижении относительно контрольных значений уровня клеток эффекторной памяти (ЕМ, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺) (рис. 1). Кроме того, у больных АС на фоне лечения анти-TNFα относительно уровней, выявленных при лечении анти-IL-17, понижается количество терминаль-

но-дифференцированных Т-хелперов (TEMRA, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁻).

При исследовании состава цитотоксических Т-лимфоцитов обнаружено, что содержание популяций EM1, EM2 и EM3 в составе цитотоксических Т-клеток у больных на фоне традиционной терапии и ГИБТ соответствует контрольному диапазону (рис. 2А, В). У пациентов с АС на фоне традиционной терапии и анти-TNF α относительно контрольных значений повышается содержание популяции EM4 (CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻CD27⁻CD28⁺) цитотоксических Т-клеток (рис. 2Г). У больных на фоне анти-TNF α относительно группы пациентов с лечением анти-IL-17 снижается уровень пре-эффекторов 1-го типа (pE1, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻CD27⁺CD28⁺) (рис. 2Д). В то же время содержание пре-эффекторов 2-го типа (pE2, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻CD27⁺CD28⁻) у больных на фоне традиционной терапии снижается относительно контрольных значений и показателей, выявляемых при лечении пациентов с АС анти-TNF α (рис. 2Е). Уровень эффекторов цитотоксических Т-лимфоцитов (E Tcyt, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻CD27⁻CD28⁻) у больных АС на фоне традиционной терапии и ГИБТ соответствует контрольному диапазону (рис. 2Ж).

С помощью корреляционного анализа исследованы взаимосвязи между клинико-лабораторными показателями и субпопуляционным составом Т-лимфоцитов в крови у больных АС в зависимости от типа проводимой терапии. Обнаружено, что у обследованных пациентов с АС на фоне традиционной терапии содержание Т-клеток популяции pE2 отрицательно коррелирует с величиной индекса ASDAS-CRP ($r = -0,60$, $p = 0,006$), тогда как уровень популяции EM1 также отрицательно взаимосвязан с концентрацией СРБ ($r = -0,52$, $p = 0,023$).

Максимальное количество взаимосвязей выявляется у больных на фоне анти-IL-17 терапии. У лиц данной группы относительное количество CD3⁺CD4⁺ клеток положительно взаимосвязано со значениями индексов BASDAI ($r = 0,60$, $p = 0,017$), ASDAS-CRP ($r = 0,63$, $p = 0,011$) и BASFI ($r = 0,55$, $p = 0,034$), а также уровнем СРБ ($r = 0,82$, $p < 0,001$). Количество TEMRA Th-лимфоцитов отрицательно коррелирует с величинами индексов BASDAI ($r = -0,65$, $p = 0,008$) и BASFI ($r = -0,63$, $p = 0,012$). Кроме того, у больных на фоне анти-IL-17 терапии содержание клеток субпопуляции E Tcyt также отрицательно взаимосвязано с величинами индексов BASDAI ($r = -0,87$, $p < 0,001$), ASDAS-CRP ($r = -0,78$,

$p = 0,001$) и BASFI ($r = -0,66$, $p = 0,007$), а также уровнем СРБ ($r = -0,63$, $p = 0,013$).

На фоне анти-TNF α у пациентов с АС с показателями субпопуляционного состава Т-лимфоцитов взаимосвязана только величина индекса BASFI: с EM2 цитотоксических Т-клеток ($r = 0,55$, $p = 0,005$) и уровнем “naive” Th-лимфоцитов ($r = -0,59$, $p = 0,002$).

Обсуждение

В основе известных механизмов этиопатогенеза АС лежит стрессовая реакция эндоплазматического ретикулаума (реакция развернутого белка, UPR, от англ. unfolded protein response) за счет индуцированного внешними факторами и/или полиморфизмом HLA-B27-антигена нарушения фолдинга белка, что, в свою очередь приводит к аутофагии клеток и развитию иммуновоспалительной реакции [29, 37]. Необходимо также отметить, что имеются результаты исследований, доказывающие прямое влияние UPR на повышенный синтез и секрецию IL-17 и TNF α клетками иммунной системы [13, 32]. Интенсивность и характер течения иммуновоспалительной реакции во многом определяется уровнем функциональной активности Т-лимфоцитов [3, 4].

Анализ субпопуляционного состава Т-лимфоцитов выполнен с использованием двух основных тактик гейтирования, которые были подробно описаны в работах Кудрявцева И.В. и соавт. (2015) и Зурочки А.В. и соавт. (2018) [3, 5]. В основе первого подхода лежит анализ Т-клеток, экспрессирующих молекулы CD45RA и CD62L, что позволило охарактеризовать состав Т-хелперов у больных АС по степени зрелости: наивные (“naive”), клетки центральной (СМ) и эффекторной памяти (ЕМ) и терминально-дифференцированные (TEMRA) Т-хелперы. Второй подход, основанный на дополнении к анализу маркеров CD27 и CD28 к уже указанным, был применен для оценки субпопуляций цитотоксических Т-клеток, что позволило более подробно охарактеризовать состав клеток эффекторной памяти (ЕМ1-4) и терминально-дифференцированных (пре-эффекторы типа 1 (pE1) и 2 (pE2), а также эффекторы (E Tcyt)) Т-киллеров [3, 5, 17].

Основные средства традиционной терапии при АС, направленные на снижение (купирование) воспаления, включают противовоспалительные препараты и глюкокортикоиды [1, 21]. В целом клиническое состояние и основные лабораторные показатели у пациентов данной группы соответствует таковым и при ГИБТ (табл. 1). Одна-

ко у больных АС на фоне традиционной терапии сохраняется более высокая частота внескелетных проявлений по сравнению с больными на фоне анти-TNF α терапии. Состояние субпопуляционного состава Т-лимфоцитов у больных АС на фоне традиционной терапии характеризуется увеличением содержания клеток центральной памяти в составе Т-хелперов, а также повышением уровня фракции EM4 (CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁻CD27⁻CD28⁺) и снижением количества рЕ2-клеток (CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻CD27⁺CD28⁻) в составе цитотоксических Т-лимфоцитов. Причем данные особенности проявляются на фоне понижения относительного количества Т-клеток в периферической крови, что, по-видимому, и связано с проведением противовоспалительной терапии. Т-хелперы центральной памяти являются клетками, прошедшими антиген-зависимую дифференцировку во вторичных лимфоидных органах, интенсивно пролиферируют в ответ на антигенную стимуляцию и определяются как самая долгоживущая популяция Т-лимфоцитов [3, 14]. Популяция EM4 цитотоксических Т-лимфоцитов характеризуется экспрессией рецептора CD28, который, являясь трансмембранным гомодимером, обеспечивает костимулирующий сигнал в механизмах активации Т-клеток с последующей пролиферацией и синтезом эффекторных цитокинов [3, 26]. Клетки данного типа экспрессируют CD127, но при отсутствии экспрессии гранзима В, что по мнению ряда авторов является доказательством их функциональной близости с субпопуляцией EM1 (наименее зрелой фракцией клеток эффекторной памяти) [5, 17]. Фракция рЕ2 цитотоксических Т-клеток определяется как пре-эффекторы, входящие в состав TEMRA. В клетках этого типа осуществляется накопление гранзима В и экспрессия маркеров, характерных для терминально-дифференцированных эффекторов [5, 16]. Необходимо отметить, что в исследовании Koch S. и соавт. (2008) представлено предположение о дифференцировке Т-клеток рЕ2 в популяцию EM4 [17]. Следовательно, можно заключить, что противовоспалительная эффективность традиционной терапии при лечении больных АС не достаточна, происходит накопление Т-лимфоцитов способных к синтезу цитокинов и с большим эффекторным потенциалом. Отрицательные корреляционные связи цитотоксических Т-клеток эффекторной памяти и пре-эффекторов с лабораторными и клиническими показателями, характеризующими активность воспаления при АС, подтверждают данный вывод.

Значения клинико-лабораторных показателей больных АС на фоне анти-IL-17 терапии не имеют значимых различий с показателями больных на фоне традиционной и анти-TNF α терапии. При этом состояние субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, включая все фракции исследуемые фракции Th- и цитотоксических Т-клеток, полностью соответствует контрольным значениям. Вместе с тем у данной категории больных выявляется максимальное количество взаимосвязей между клинико-лабораторными параметрами и показателями субпопуляционного состава Т-лимфоцитов. Прежде всего необходимо отметить положительные взаимосвязи относительного содержания Th-лимфоцитов со всеми индексами, характеризующими активность АС, и уровнем СРБ в сыворотке крови. Указанные корреляционные связи характеризуют роль субпопуляции Т-хелперов в развитии иммуновоспалительных процессов при АС. В то же время у больных АС на фоне анти-IL-17 терапии выявляются отрицательные взаимосвязи эффекторов Th- (TEMRA Th) и цитотоксических (E Tcvt) Т-клеток с клинико-лабораторными показателями. Исходя из данных корреляционных связей можно заключить, что накопление зрелых эффекторных клеток, обладающих выраженным провоспалительным потенциалом, обратно пропорционально активности АС, что позволяет рассматривать данные популяции клеток в качестве новых маркеров для оценки эффективности применяемой терапии при данном заболевании. Возможно, что за счет снижения экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2, эффекторные Т-клетки при стимуляции Т-клеточного рецептора погибают путем апоптоза [3, 19]. Также необходимо отметить, что основными мишенями для IL-17 являются эпителиальные клетки, фибробласты, синовиоциты и кератиноциты [25, 31]. Соответственно, «выключение» цитокина при анти-IL-17 терапии преимущественно повлияет на активность суставного воспаления, в то время как функциональная активность основных фракций Th- и цитотоксических Т-клеток будет зависеть только от стандартных средств противовоспалительной терапии.

Известно, что патогенетическими эффектами TNF α при АС, который вырабатывается макрофагами синовиальной ткани, является повышение продукции дифференцировки остеокластов TNFSF11 (RANKL) — ключевой фактор дифференцировки и активации остеокластов, а также индуктор экспрессии хемокинов, простагландинов и рецепторов адгезии [20, 35]. Кроме

того, TNFSF11 экспрессируется на мембране Т-хелперов, регулируя межклеточные взаимодействия в иммунной системе [36]. TNF α является мощным провоспалительным цитокином, стимулирующим функциональную активность клеток врожденного и адаптивного иммунитета [2, 4]. Соответственно, у больных АС на фоне анти-TNF α терапии выявляется минимальная частота внескелетных проявлений и наиболее выраженные изменения в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов (по сравнению со стандартной и анти-IL-17 терапией). На фоне анти-TNF α терапии у обследованных пациентов в крови повышается абсолютное количество Т-лимфоцитов, что, соответственно, проявляется в увеличении абсолютного количества Th- и цитотоксических Т-клеток. В составе субпопуляции Th-клеток у пациентов данной группы повышается содержание СМ-клеток, но при снижении уровня ЕМ Th-лимфоцитов и минимального количества эффекторных TEMRA Th-клеток. ЕМ Th-клетки активно экспрессируют адгезионные и хемокиновые рецепторы, что определяет их способность мигрировать в периферические ткани [3, 30]. Доказано, что основная часть фракции ЕМ Th-лимфоцитов представлена эффекторными клетками со сниженным пролиферативным потенциалом и повышенной способностью к синтезу эффекторных цитокинов (включая TNF α) [3, 17]. Соответственно, можно констатировать, что у больных АС на фоне анти-TNF α терапии снижается эффекторный потенциал Th-клеток. Также необходимо отметить, что единственная корреляционная взаимосвязь с клиническими показателями (индекс BASFI) у пациентов данной категории обнаружена у “naïve” Th-лимфоцитов, т.е. для наименее зрелой фракции Т-хелперов. Причем данная взаимосвязь является отрицательной, что определяет значимость снижения эффекторного потенциала Th-клеток в патогенезе АС и подтверждает эффективность анти-TNF α терапии.

На фоне анти-TNF α терапии больных АС установлены изменения и в составе цитотоксических Т-клеток, которые проявляется в увеличении количества клеток фракции ЕМ4, но при снижении содержания рЕ1. Также относительно показателей, выявленных у больных на фоне стандартной терапии, при применении анти-TNF α препаратов увеличивается уровень рЕ2 цитотоксических Т-клеток. Следовательно, эффекторный потенциал цитотоксических Т-лимфоцитов при проведении анти-TNF α терапии сохраняется. Причем наличие положитель-

ной корреляционной связи между величиной индекса BASFI и относительным количеством ЕМ2 цитотоксических Т-клеток подтверждает данное заключение.

Заключение

Таким образом, субпопуляционный состав Т-лимфоцитов у больных АС значительно различается в зависимости от типа проводимой терапии. У больных АС на фоне традиционной противовоспалительной терапии в крови снижается содержание Т-лимфоцитов, но при повышении относительного количества Т-клеток с высоким уровнем эффекторного потенциала и секреции цитокинов. Отрицательные взаимосвязи уровней цитотоксических Т-клеток эффекторной памяти и пре-эффекторов с лабораторными и клиническими показателями активности воспаления при АС характеризуют недостаточную эффективность традиционной терапии, проявляющуюся, в частности, в высокой частоте внескелетных проявлений по сравнению с больными на фоне анти-TNF α терапии. Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов у больных АС на фоне анти-IL-17 терапии полностью соответствует контрольным значениям, так же как и значения клинико-лабораторных показателей не имеют значимых различий с показателями больных на фоне традиционной и анти-TNF α терапии. Однако, исходя из многочисленных взаимосвязей между иммунологическими и клинико-лабораторными показателями, сделано заключение об ингибирующем влиянии анти-IL-17 терапии на активность суставного воспаления, тогда как состояние субпопуляционного состава Т-клеток будет зависеть от стандартных средств противовоспалительной терапии. Наиболее выраженные изменения в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов обнаружены у больных АС при анти-TNF α терапии, что проявляется в снижении эффекторного потенциала Th-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов. При этом у больных АС именно на фоне анти-TNF α терапии обнаружена минимальная частота внескелетных проявлений. Соответственно, можно заключить, что более высокая эффективность ГИБТ (по сравнению с традиционными методами терапии) определяется механизмами воздействия на иммунные мишени патогенеза АС, что проявляется, в том числе, изменением субпопуляционного состава Т-лимфоцитов. Причем, исходя из полученных результатов, применение анти-TNF α в сравнении с ингибиторами анти-IL-17 в большей степени оказывает влияние на фенотипический состав Т-клеток.

Список литературы / References

1. Ахунова Р.Р., Ахунова Г.Р. Комплексный подход к терапии анкилозирующего спондилита с позиции международной классификации функционирования // Архив внутренней медицины, 2020. Т. 10, № 1. С. 5-9. [Akhunova R.R., Akhunova G.R. An integrated approach to the treatment of ankylosing spondylitis from the position of the international classification of functioning. *Arkhiv vnutrenney meditsiny = Russian Archives of Internal Medicine*, 2020, Vol. 10, no. 1, pp. 5-9. (In Russ.)]
2. Воронина Е.В., Лобанова Н.В., Яхин И.Р., Романова Н.А., Серегин Ю.А. Роль фактора некроза опухоли-альфа в иммунопатогенезе заболеваний различной этиологии и его значимость в развитии антицитокиновой терапии моноклональными антителами // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 797-806. [Voronina E.V., Lobanova N.V., Yakhin I.R., Romanova N.A., Seregin Yu.A. Role of tumor necrosis factor alpha in immune pathogenesis of different diseases and its significance for evolving anticytokine therapy with monoclonal antibodies. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 797-806. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-797-806.
3. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: Уральское отделение РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in biomedical research]. Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 720 p.
4. Козлов В.А., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Козлов И.Г., Кудлай Д.А., Продеус А.П., Борисов А.Г. Клиническая иммунология: практическое пособие для врачей. Красноярск: Поликор, 2020. 386 с. [Kozlov V.A., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Kozlov I.G., Kudlai D.A., Prodeus A.P., Borisov A.G. Clinical immunology: a practical guide for physicians]. Krasnoyarsk: Polikor, 2020. 386 p.
5. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Васильева Е.В., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотolian Арег А. Фенотипическая характеристика цитотоксических Т-лимфоцитов: регуляторные и эффекторные молекулы // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 227-240. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Vasilyeva E.V., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Totolian Areg A. Phenotypic characterisation of peripheral blood cytotoxic T lymphocytes: regulatory and effector molecules. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 227-240. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-227-240.
6. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 525-538. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T cell subsets. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 525-538. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-525-538.
7. Насонов Е.Л., Коротаева Т.В., Дубинина Т.В., Лиля А.М. Ингибиторы ИЛ23/ИЛ17 при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях: новые горизонты // Научно-практическая ревматология, 2019. Т. 57, № 4. С. 400-406. [Nasonov E.L., Korotaeva T.V., Dubinina T.V., Lila A.M. IL-23/IL-17 Inhibitors in immunoinflammatory rheumatic diseases: new horizons. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2019, Vol. 57, no. 4, pp. 400-406. (In Russ.)]
8. Эрдес Ш.Ф. Интерлейкин 17А – новая мишень антицитокиновой терапии анкилозирующего спондилита // Научно-практическая ревматология, 2016. Т. 54, № 1S. С. 60-66. [Erdes S.F. Interleukin-17A is a new target of anticytokine therapy for ankylosing spondylitis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2016, Vol. 54, no. 1S, pp. 60-66. (In Russ.)]
9. Abdal S.J., Yesmin S., Shazzad M.N., Azad M.A.K., Shahin M.A., Choudhury M.R., Islam M.N., Haq S.A. Development of a Bangla version of the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI). *Int. J. Rheum. Dis.*, 2021, Vol. 24, no. 1, pp. 74-80.
10. Ahmadi M., Hajjalilo M., Dolati S., Eghbal-Fard S., Heydarlou H., Ghaebi M., Ghassemlaglou A., Aghebati-Maleki L., Samadi Kafil H., Kamrani A., Rahnema B., Rikhtegar R., Yousefi M. The effects of nanocurcumin on Treg cell responses and treatment of ankylosing spondylitis patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Cell. Biochem.*, 2020, Vol. 121, no. 1, pp. 103-110.
11. Al-Mossawi M.H., Chen L., Fang H., Ridley A., de Wit J., Yager N., Hammitzsch A., Pulyakhina I., Fairfax B.P., Simone D., Yi Y., Bandyopadhyay S., Doig K., Gundle R., Kendrick B., Powrie F., Knight J.C., Bowness P. Unique transcriptome signatures and GM-CSF expression in lymphocytes from patients with spondyloarthritis. *Nat. Commun.*, 2017, Vol. 8, no. 1, 1510. doi: 10.1038/s41467-017-01771-2.
12. Chen B., Li J., He C., Li D., Tong W., Zou Y., Xu W. Role of HLA-B27 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis (Review). *Mol. Med. Rep.*, 2017, Vol. 15, no. 4, pp. 1943-1951.
13. Chen L., Liu L., Xie Z.Y., Wang F., Sinkemani A., Zhang C., Wang X.H., Wang K., Hong X., Wu X.T. Endoplasmic reticulum stress facilitates the survival and proliferation of nucleus pulposus cells in TNF- α Stimulus by activating unfolded protein response. *DNA Cell Biol.*, 2018, Vol. 37, no. 4, pp. 347-358.

14. Faist B., Schlott F., Stemberger C., Dennehy K.M., Krackhardt A., Verbeek M., Grigoleit G.U., Schiemann M., Hoffmann D., Dick A., Martin K., Hildebrandt M., Busch D.H., Neuenhahn M. Targeted in-vitro-stimulation reveals highly proliferative multi-virus-specific human central memory T cells as candidates for prophylactic T cell therapy. *PLoS One*, 2019, Vol. 14, no. 9, e0223258. doi: 10.1371/journal.pone.0223258.
15. Feng X., Yang Q., Wang C., Tong W., Xu W. Punicalagin exerts protective effects against ankylosing spondylitis by regulating NF- κ B-TH17/JAK2/STAT3 signaling and oxidative stress. *Biomed. Res. Int.*, 2020, Vol. 2020, 4918239. doi: 10.1155/2020/4918239.
16. Gupta S., Su H., Narsai T., Agrawal S. SARS-CoV-2-Associated T-Cell responses in the presence of humoral immunodeficiency. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2021, Vol. 182, no. 3, pp. 195-209.
17. Koch S., Larbi A., Derhovanessian E., Ozcelik D., Naumova E., Pawelec G. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun. Ageing*, 2008, Vol. 5, 6. doi: 10.1186/1742-4933-5-6.
18. Lee S., Eun Y., Kim H., Cha H.S., Koh E.M., Lee J. Machine learning to predict early TNF inhibitor users in patients with ankylosing spondylitis. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 20299. doi: 10.1038/s41598-020-75352-7.
19. Libri V., Azevedo R.I., Jackson S.E., Di Mitri D., Lachmann R., Fuhrmann S., Vukmanovic-Stejić M., Yong K., Battistini L., Kern F., Soares M.V., Akbar A.N. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. *Immunology*, 2011, Vol. 132, no. 3, pp. 326-339.
20. Lovšin N., Marc J. Glucocorticoid receptor regulates TNFSF11 transcription by binding to glucocorticoid responsive element in TNFSF11 proximal promoter region. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 3, 1054. doi: 10.3390/ijms22031054.
21. Ma S.Y., Wang Y., Xu J.Q., Zheng L. Cupping therapy for treating ankylosing spondylitis: The evidence from systematic review and meta-analysis. *Complement Ther. Clin. Pract.*, 2018, Vol. 32, pp. 187-194.
22. Machado P.M., Landewé R., Heijde D.V.; Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS). Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): 2018 update of the nomenclature for disease activity states. *Ann. Rheum. Dis.*, 2018, Vol. 77, no. 10, pp. 1539-1540.
23. Maneiro J.R., Souto A., Salgado E., Mera A., Gomez-Reino J.J. Predictors of response to TNF antagonists in patients with ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis: systematic review and meta-analysis. *RMD Open*, 2015, Vol. 1, no. 1, e000017. doi: 10.1136/rmdopen-2014-000017.
24. Miao J., Zhu P. Functional defects of treg cells: new targets in rheumatic diseases, including ankylosing spondylitis. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2018, Vol. 20, no. 5, 30. doi: 10.1007/s11926-018-0729-1.
25. Miossec P. Local and systemic effects of IL-17 in joint inflammation: a historical perspective from discovery to targeting. *Cell Mol. Immunol.*, 2021, Vol. 18, no. 4, pp. 860-865.
26. Nagai S., Azuma M. The CD28-B7 family of co-signaling molecules. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019, Vol. 1189, pp. 25-51.
27. Nam E.J., Lee W.K. Early achievement of ASDAS clinical response is associated with long-term improvements in metrological outcomes in patients with ankylosing spondylitis treated with TNF- α blockers. *Medicine (Baltimore)*, 2020, Vol. 99, no. 41, e22668. doi: 10.1097/MD.00000000000022668.
28. Ortolan A., Ramiro S., van Gaalen F., Kvien T.K., Landewe R.B.M., Machado P.M., Ruysen-Witrand A., van Tubergen A., Bastiaenen C., van der Heijde D. Development and validation of an alternative ankylosing spondylitis disease activity score when patient global assessment is unavailable. *Rheumatology (Oxford)*, 2021, Vol. 60, no. 2, pp. 638-648.
29. Pedersen S.J., Maksymowych W.P. The Pathogenesis of ankylosing spondylitis: an update. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2019, Vol. 21, no. 10, 58. doi: 10.1007/s11926-019-0856-3.
30. Qiu J., Zhou F., Li X., Zhang S., Chen Z., Xu Z., Lu G., Zhu Z., Ding N., Lou J., Ye Z., Qian Q. Changes and clinical significance of detailed peripheral lymphocyte subsets in evaluating the immunity for cancer patients. *Cancer Manag. Res.*, 2020, Vol. 12, pp. 209-219.
31. Russell T., Bridgewood C., Rowe H., Altaie A., Jones E., McGonagle D. Cytokine "fine tuning" of entheses tissue homeostasis as a pointer to spondyloarthritis pathogenesis with a focus on relevant TNF and IL-17 targeted therapies. *Semin. Immunopathol.*, 2021, Vol. 43, no. 2, pp. 193-206.
32. Shimizu Y., Tsukada T., Sakata-Haga H., Sakai D., Shoji H., Saikawa Y., Hatta T. Exposure to maternal immune activation causes congenital unfolded protein response defects and increases the susceptibility to postnatal inflammatory stimulation in offspring. *J. Inflamm. Res.*, 2021, Vol. 14, pp. 355-365.
33. Tahir H., Moorthy A., Chan A. Impact of secukinumab on patient-reported outcomes in the treatment of ankylosing spondylitis: current perspectives. *Open Access Rheumatol.*, 2020, Vol. 12, pp. 277-292.
34. van der Linden S., Valkenburg H.A., Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.*, 1984, Vol. 27, no. 4, pp. 361-368.

35. Vargas-Franco J.W., Castaneda B., Gama A., Mueller C.G., Heymann D., Rédini F., Lézot F. Genetically-achieved disturbances to the expression levels of TNFSF11 receptors modulate the effects of zoledronic acid on growing mouse skeletons. *Biochem. Pharmacol.*, 2019, Vol. 168, pp. 133-148.
36. Walsh M.C., Choi Y. Regulation of T cell-associated tissues and T cell activation by RANKL-RANK-OPG. *J. Bone Miner. Metab.*, 2021, Vol. 39, no. 1, pp. 54-63.
37. Watad A., Bridgewood C., Russell T., Marzo-Ortega H., Cuthbert R., McGonagle D. The early phases of ankylosing spondylitis: emerging insights from clinical and basic science. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2668. doi: 10.3389/fimmu.2018.02668.
38. Xu F., Guanghao C., Liang Y., Jun W., Wei W., Baorong H. Treg-promoted new bone formation through suppressing TH17 by secreting Interleukin-10 in ankylosing spondylitis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2019, Vol. 44, no. 23, pp. E1349-E1355.

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»; заведующий кафедрой физиологии имени профессора А.Т. Пшоники ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Гриценко О.Д. — аспирант кафедры факультетской терапии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, 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»; доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, 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; Head, A. Pshonik Department of Physiology, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Gritsenko O.D., Postgraduate Student, Department of Faculty Therapy with a PE-course, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University, 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; Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Серебрякова М.К. — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Мастерова А.А. — врач отделения общей врачебной практики ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Шестерня П.А. — д.м.н., профессор, проректор по науке ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

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

Serebriakova M.K., Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Masterova A.A., Medical Doctor, Krasnoyarsk State V. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Shesternya P.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Rector for Research, Krasnoyarsk State V. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 28.04.2021
Принята к печати 29.09.2021

Received 28.04.2021
Accepted 29.09.2021

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОНУКЛЕАРОВ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ВЕНОЗНОЙ И КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Сенникова С.В.¹, Топтыгина А.П.^{1, 3}, Семикина Е.Л.^{2, 4}, Закиров Р.Ш.², Акулова С.С.²

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

² ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁴ ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Псориаз считается аутоиммунным заболеванием с преимущественно клеточным механизмом реализации патологии. Исследования иммунопатогенеза псориаза сделаны либо на модельных животных, а это не совсем то же самое, что и у человека, либо данные получены методом кожного окна у пациентов, что травматично, или исследуя венозную кровь, но в венозной крови трудно вычленить параметры местного иммунного ответа. Нами была предпринята попытка найти удобный, как для пациента, так и для исследователя, и адекватный способ оценки местных иммунных процессов, происходящих в пораженной псориазом коже. Были обследованы 20 пациентов с верифицированным диагнозом псориаз, средний возраст составил 44,3 года. В контрольную группу вошли 15 практически здоровых взрослых, средний возраст 46,6 года. Капиллярную кровь брали из пальца руки, а у псориазных больных вблизи очага с клиническими проявлениями в конечном объеме 400 мкл в две микроветы. Венозную кровь забирали из локтевой вены в вакуумную пробирку с ЭДТА в объеме 3 мл. Клинический анализ венозной и капиллярной крови производили на гематологическом автоматизированном анализаторе. Иммунофенотипирование проводили путем четырехцветного окрашивания цельной капиллярной и венозной крови с последующим лизированием эритроцитов. Цитофлуорометрию проводили с использованием технологии и реактивов BD Biosciences (США). Цитокины в плазме крови определяли мультиплексным методом (MagPix, BioRad, США). В клиническом анализе крови разницы между капиллярной и венозной кровью ни в группе здоровых, ни в группе больных псориазом выявлено не было. У здоровых людей субпопуляционный состав моноклеаров, как в венозной, так и в капиллярной крови не различался. У больных псориазом выявлены значимые повышения как в капиллярной, так и в венозной крови, уровней дважды положительных лимфоцитов

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина, Р.Ш. Закиров, С.С. Акулова «Субпопуляционный состав моноклеаров и цитокиновый профиль венозной и капиллярной крови больных псориазом и здоровых людей» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1333-1346. doi: 10.15789/1563-0625-MSA-2391
© Сенникова С.В. и соавт., 2021

For citation:

S.V. Sennikova, A.P. Toptygina, E.L. Semikina, R.Sh. Zakirov, S.S. Akulova "Mononuclear subsets and cytokine profile of venous and capillary blood in patients with psoriasis and healthy people", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1333-1346. doi: 10.15789/1563-0625-MSA-2391
DOI: 10.15789/1563-0625-MSA-2391

(CD45RA⁺/CD45R0⁺), В-лимфоцитов и NKT-лимфоцитов как в процентном, так и в абсолютном выражении. В капиллярной крови больных псориазом отмечается значимое повышение процента наивных Т-лимфоцитов, активированных хелперов (Th_{act}) и Treg, а также В1-клеток и Breg и значимое снижение В2-лимфоцитов. В венозной крови псориазных больных выявлено только значимое повышение Th_{act}, Treg и Breg. В капиллярной крови больных псориазом обнаружено значимое повышение уровней не классических M2-моноцитов и воспалительных M_{infl} моноцитов и снижение уровня классических M1-моноцитов, в венозной крови псориазных больных выявлено только повышение воспалительных M_{infl} моноцитов. В капиллярной крови уровни всех исследованных цитокинов больных псориазом значимо превышают уровни соответствующих цитокинов в группе здоровых, за исключением IL-10, уровень которого не отличался от группы здоровых. В венозной крови уровни большинства исследованных цитокинов в группе больных псориазом не отличались от группы здоровых. Исключение составили повышение примерно в 2 раза цитокинов: IL-4, IL-21, IL-23 и TNF.

Субпопуляционный состав мононуклеаров и цитокиновый профиль капиллярной и венозной крови здоровых людей значимо не различаются. Предложенный нами метод определения субпопуляционного состава мононуклеаров и профиля цитокинов капиллярной крови из зоны псориазного поражения можно использовать для мониторинга местного иммунитета у больных псориазом. Он существенно менее травматичный, чем метод кожного окна, и более информативный, чем исследование венозной крови.

Ключевые слова: псориаз, цитокины, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, субпопуляции лимфоцитов, моноциты, капиллярная кровь

MONONUCLEAR SUBSETS AND CYTOKINE PROFILE OF VENOUS AND CAPILLARY BLOOD IN PATIENTS WITH PSORIASIS AND HEALTHY PEOPLE

Sennikova S.V.^a, Toptygina A.P.^{a, c}, Semikina E.L.^{b, d}, Zakirov R.Sh.^b, Akulova S.S.^b

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

^b Federal State Autonomous Institution "National Medical Research Center of Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

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

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

Abstract. Psoriasis is considered an autoimmune disease with a predominantly cellular mechanism for the development of disorder. Studies in immune pathogenesis of psoriasis were performed either in animal model, which is not just similar to humans, or the data were obtained in patients by means of skin window method, which is traumatic, or by examining venous blood. However, it is difficult to discern parameters of the local immune response in venous blood samples. We have attempted to find an adequate method which would be convenient both for the patient and for the researcher, in order to assess local immune processes occurring in the skin affected by psoriasis. We examined 20 patients with a verified diagnosis of psoriasis, the average age was 44.3 years. The control group included 15 healthy adults, with average age of 46.6 years. Capillary blood was taken by fingerprick, whereas, in psoriatic patients, the samples were taken near the psoriatic lesion at a final volume of 400 µL in two microvettes. Venous blood (3 mL) was taken from the cubital vein into a vacuum tube with EDTA. Clinical analysis of venous and capillary blood was performed in automated hematological analyzer. Immunophenotyping was performed by four-color staining of whole capillary and venous blood followed by lysis of erythrocytes. Cytofluorometry was performed using techniques and reagents from BD Biosciences (USA). Plasma cytokines were determined by multiplex approach (MagPix, BioRad, USA).

Upon clinical analysis of blood, the difference between capillary and venous blood was not found, either in healthy group, or among patients with psoriasis. In healthy people, the subsets of mononuclear cells, did not differ between venous and capillary blood. The samples of capillary and venous blood in the patients with psoriasis showed significantly increased levels of double-positive lymphocytes (CD45RA⁺/CD45R0⁺),

B lymphocytes and NKT lymphocytes (both for relative and absolute values). A significant increase in the percentage of naive T lymphocytes, activated helpers (Th_{act}) and Treg, as well as B1 cells and Breg, and a significant decrease in B2 lymphocytes was registered in capillary blood of the patients with psoriasis. In venous blood samples from psoriatic patients, only a significant increase in Th_{act}, Treg, and Breg was revealed. In the capillary blood of patients with psoriasis, we found a significant increase in the levels of non-classical M2 monocytes and inflammatory M_{infl} monocytes, and a decrease in classical M1 monocyte levels; in venous blood of psoriatic patients, only an increase in inflammatory M_{infl} monocytes was revealed. In capillary blood, all the studied cytokines in psoriasis patients significantly exceeded the levels of corresponding cytokines in healthy controls, except of IL-10. The levels of this cytokine did not differ from healthy group. In venous blood, the levels of most studied cytokines in the group of patients with psoriasis did not differ from the group of healthy ones. Approximately two-fold increase was revealed for IL-4, IL-21, IL-23 and TNF.

First, the subsets of mononuclear cells and the cytokine profile of capillary and venous blood of healthy people did not differ significantly. Secondly, our proposed method for determining the subsets of mononuclear cells and capillary blood cytokines profile from the area of psoriatic lesions may be used to monitor local immunity in the patients with psoriasis. This approach is significantly less traumatic than the skin window method and more informative than the studies of venous blood.

Keywords: psoriasis, cytokines, T lymphocytes, B lymphocytes, lymphocyte subsets, monocytes, capillary blood

Введение

Псориаз — системное хроническое мультифакториальное воспалительное заболевание аутоиммунной природы с доказанным влиянием генетических факторов, характеризующееся интенсивной пролиферацией кератиноцитов, нарушением их дифференцировки и дисбалансом про- и противовоспалительных факторов иммунитета [4, 22]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, псориаз — это значимая проблема, и встречается у 2-4% населения [37]. Дебют псориаза фиксируется в возрастных группах от 15 до 20 и от 55 до 60 лет, при этом среди мужчин и женщин псориаз встречается одинаково часто [17]. Более тяжелое и распространенное течение псориаза в молодом возрасте связано с наследственным анамнезом [21]. Носители HLA-C*06:02 аллеля, и родственных аллелей HLA-C*07:01, HLA-C*07:02 и HLA-B*27 экспрессируют аутопептиды, закодированные в локусе PSORS1 (psoriasis susceptibility locus 1) на 6-й хромосоме в положении 6p21.3. [10], которые распознаются CD8⁺ лимфоцитами. Для запуска воспалительного заболевания необходимы также триггерные факторы окружающей среды. К таким факторам относят злоупотребление алкоголем и никотином, стрессы, инфекции и травмы (феномен Кебнера), воздействие фармакологических препаратов [8, 21]. Пациенты с клинически активными формами псориаза отмечают снижение качества жизни, эмоциональную лабильность, нарастающую тревожность, депрессию и суицидальные мысли [15]. У подавляющего большинства пациентов (до 90%) диагностируется бляшечная форма псориаза [4]. Дерматологическое

проявление псориаза характеризуется хроническими эритематозными бляшками, инфильтрированными с обильным серебристо-белесыми чешуйками на поверхности, чаще на разгибательных поверхностях конечностей, волосистой части головы, крестцовой и пупочной области. Субъективно пациенты отмечают болезненность, зуд и частую ошущение по типу жжения [22, 32]. Индекс тяжести псориаза PASI (Psoriasis Area and Severity Index) используется в качестве стандартного метода для оценки активности псориаза и эффективности предложенной терапии, в определенный временной промежуток [26].

Псориаз считается аутоиммунным заболеванием с преимущественно клеточным механизмом реализации патологии [9]. В фазе инициации заболевания в ответ на триггерные факторы кератиноциты секретируют антимикробные пептиды, такие как β-дефензины и S100A7 (псориазин) и активный пептид кателицидина LL37 [3, 6]. Последние в комплексе с собственной ДНК и РНК, выделяющейся из поврежденных кератиноцитов, способны индуцировать плазматцитоидные (pDC) и классические дендритные клетки (DC) [35]. Важным событием в формировании псориатической бляшки является активация pDC и продукция интерферонов типа I (IFNα и IFNβ). Передача сигналов IFN типа I способствует развитию миелоидных DC, которые участвуют в дифференцировке Th1 и Th17. Созревающие DC мигрируют в региональные лимфоузлы, где активируют и вовлекают в воспалительный процесс Т-лимфоциты [16, 23, 28, 31]. Продукция медиаторов воспаления приводит к клиническим проявлениям псориаза, а именно акантозу (усиленная пролиферация базальных и шиповидных

клеток эпидермиса) связанному с IL-22, феномену Ауспица и повышенной продукции ангиогенных факторов Т-клетками [25, 33, 39], что способствует специфической гиперплазии эпидермиса [11, 38]. При фенотипировании Т-клеток пациентов с псориазом обнаружены преимущественно активированные Т-клетки памяти с фенотипом $CD2^+CD3^+CD5^+CLA^+CD28^{lo}CD45RO^+$, большинство из которых экспрессируют маркеры активации HLA-DR, CD25 (IL-2R) как на $CD4^+$, так и на $CD8^+$ клетках [19]. Показано, что при псориазе нарушена функция Treg, связанная с неспособностью подавить аутовоспаление [5, 14, 31].

Цитокины, продуцируемые различными субпопуляциями лимфоцитов, такие как $IFN\gamma$, IL-17 и IL-22, способны индуцировать продукцию других цитокинов, например IL-36, образуя с ними петлю положительной обратной связи [7]. В то же время дисбаланс между про- и противовоспалительными цитокинами формирует хронический воспалительный аутоиммунный процесс в пораженной псориазом коже [1]. Исследования, касающиеся иммунопатогенеза псориаза, сделаны либо на модельных животных, а это не совсем то же самое, что и у человека, поскольку у мышей псориаза не бывает, это всегда искусственное воспроизведение заболевания, либо данные получены методом кожного окна у пациентов, что травматично, и невозможно использовать этот метод для динамического наблюдения за пациентами. Также используют исследование венозной крови, как клеточного состава, так и гуморальных факторов, но в венозной крови трудно выделить параметры местного иммунного ответа в пораженной коже от системных ответов целого организма на различные факторы окружающей среды. Нами была предпринята попытка найти удобный, как для пациента, так и для исследователя, и адекватный способ оценки местных иммунных процессов, происходящих в пораженной псориазом коже.

Цель работы — изучить и сопоставить субпопуляционный состав мононуклеаров и цитокиновый профиль венозной и капиллярной крови из зоны воспаления у больных псориазом по сравнению со здоровыми людьми.

Материалы и методы

Основную группу обследованных составили 20 пациентов (12 мужчин и 8 женщин) с верифицированным диагнозом псориаз. Критерии включения пациентов в исследование: наличие клинически подтвержденного псориаза в прогрессирующей стадии, легкой и средней степени тяжести, возраст от 18 до 70 лет. Средний возраст

обследованных составил 44,3 года. Для оценки степени выраженности патологического кожного процесса у больных псориазом использовался индекс PASI (Psoriasis Area and Severity Index), средний индекс по группе составил 13,53. В контрольную группу вошли 15 практически здоровых взрослых (9 мужчин и 6 женщин), сопоставимых по возрасту, средний возраст 46,6 года. Обследованные подписывали информированное согласие. Взятие капиллярной крови производили из пальца руки, а у псориатических больных вблизи очага с клиническими проявлениями в конечном объеме 400 мкл в две микроветы (Microvette 200 K3 EDTA). Забор периферической крови из локтевой вены производили в вакуумную пробирку с ЭДТА в объеме 3 мл. Клинический анализ венозной и капиллярной крови производили на гематологическом автоматизированном 5 Diff анализаторе Sysmex XS, при необходимости осуществляли контроль формулы крови врачом-цитологом по мазку. Плазму крови в объеме 50 мкл, полученную путем отстаивания проб крови, разливали в пробирки типа Эппендорф, замораживали и хранили до использования при -30°C .

Для проведения иммунофенотипирования четырехцветное окрашивание осуществляли в цельной капиллярной и венозной крови с последующим лизированием эритроцитов [2]. Проточную цитофлюорометрию проводили с использованием технологии и реактивов BD Biosciences (США) — проточный цитометр BD FACS CantoII, программа сбора и обработки информации FACSDiva. Лимфоидный регион выделяли по показателям прямого и бокового светорассеяния с учетом экспрессии CD45/CD14. Для определения субпопуляций лимфоцитов использовали следующие поверхностные маркеры: CD16-FITC, CD14-PE, CD45PerCP, CD3-FITC, CD16/56-PE, CD4-PerCP, CD8-APC, CD45RA-FITC, CD45R0-PE, CD161-APC, CD25-FITC, CD127-PE, CD249-APC, CXCR5-APC, CD27-FITC, CD1d-PE, CD5-PerCP, CD19-APC, что позволило выявить 22 субпопуляции мононуклеаров периферической крови. Анализ данных иммунофлюоресценции включал комплекс показателей. Оценивался общий уровень основных субпопуляций лимфоцитов (процент в составе лимфоцитов и абсолютное число); а также распределение субпопуляций с различным иммунофенотипом среди $CD3^+CD4^+$ клеток, В-клеток и моноцитов.

Цитокины в плазме крови (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-33, $IFN\gamma$, TNF) определяли мультиплексным методом (MagPix, BioRad, США) с использова-

нием коммерческих тест-систем (определяемый динамический диапазон 0,2–3200 пг/мл).

Полученные результаты подвергли обработке методами вариационной статистики (программные пакеты Statistica и Microsoft Excel). Для каждого показателя была подтверждена статистическая гипотеза о нормальности распределения данных методом Колмагорова–Смирнова. Вычисляли среднюю арифметическую и ее стандартную ошибку ($M \pm SE$), различия между группами оценивали с помощью параметрического t -критерия. Уровень $p < 0,05$ считали значимым.

Результаты

По данным, полученным с гематологического анализатора, разницы между капиллярной и венозной кровью ни в группе здоровых, ни в группе больных псориазом выявлено не было, как для параметров красной, так и для белой крови. Результаты представлены в таблице 1. Это означает, что при взятии проб крови процедуры выполнялись корректно, а описанные ниже различия в субпопуляциях лимфоцитов и моноцитов связаны с активной миграцией этих клеток в ткани и

обратно в кровоток, в зависимости от локальной ситуации.

Средние значения содержания основных субпопуляций лимфоцитов в капиллярной и венозной крови здоровых людей представлены в таблице 2. Из таблицы видно, что исследованные показатели в венозной крови, как в процентном, так и в абсолютном выражении немного ниже, чем в капиллярной. Однако статистические расчеты показывают, что эти различия незначимы. Следовательно, у здоровых людей основной субпопуляционный состав, как в венозной, так и в капиллярной крови не различается. В таблице 3 представлены аналогичные данные для группы больных псориазом. В этой группе также сохраняется тенденция чуть более низких показателей в венозной крови по сравнению с капиллярной, но различия также не достоверны. Интересно, что уровень большинства основных субпопуляций лимфоцитов как в процентном, так и в абсолютном выражении значимо не отличается от уровня здоровых людей как в капиллярной, так и в венозной крови. В то же время выявлены значимые повышения ($p < 0,05$) как в

ТАБЛИЦА 1. СОПОСТАВЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КАПИЛЛЯРНОЙ И ВЕНОЗНОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

TABLE 1. COMPARISON OF PARAMETERS OF CLINICAL ANALYSIS OF CAPILLARY AND VENOUS BLOOD OF HEALTHY AND PATIENTS WITH PSORIASIS

	Здоровые Healthy people		Больные псориазом Patients with psoriasis	
	Капилляр Capillary	Вена Vein	Капилляр Capillary	Вена Vein
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	139,0 $\pm$ 5,4	139,0 $\pm$ 5,1	150,0 $\pm$ 4,4	149,0 $\pm$ 2,8
Эритроциты, 10 ¹² л Erythrocytes, 10 ¹² L	4,60 $\pm$ 0,22	4,78 $\pm$ 0,23	4,99 $\pm$ 0,15	4,97 $\pm$ 0,11
Лейкоциты, 10 ⁹ л Leukocytes, 10 ⁹ L	7,01 $\pm$ 0,45	7,04 $\pm$ 0,42	7,67 $\pm$ 0,48	7,67 $\pm$ 0,47
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	58,00 $\pm$ 1,73	58,00 $\pm$ 1,63	59,00 $\pm$ 1,69	60,00 $\pm$ 1,59
Эозинофилы, % Eosinophils, %	2,00 $\pm$ 0,32	2,00 $\pm$ 0,31	2,00 $\pm$ 0,33	2,00 $\pm$ 0,34
Базофилы, % Basophils, %	1,00 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,11
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	32,00 $\pm$ 1,76	32,00 $\pm$ 1,77	30,00 $\pm$ 1,64	29,00 $\pm$ 1,66
Моноциты, % Monocytes, %	8,00 $\pm$ 0,41	8,00 $\pm$ 0,42	8,00 $\pm$ 0,36	8,00 $\pm$ 0,32
Лимфоциты, абс., 10 ⁹ л Lymphocytes, abs., 10 ⁹ L	2,25 $\pm$ 0,11	2,25 $\pm$ 0,13	2,20 $\pm$ 0,13	2,12 $\pm$ 0,12
Моноциты абс., 10 ⁹ л Monocytes abs., 10 ⁹ L	0,560 $\pm$ 0,047	0,540 $\pm$ 0,045	0,620 $\pm$ 0,041	0,630 $\pm$ 0,045

ТАБЛИЦА 2. ОСНОВНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ В ГРУППЕ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ. СОПОСТАВЛЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОЙ И ВЕНОЗНОЙ КРОВИ

TABLE 2. MAIN LYMPHOCYTE SUBSETS IN THE GROUP OF HEALTHY DONORS. COMPARISON OF CAPILLARY AND VENOUS BLOOD

	Капилляр Capillary		Вена Vein	
	%	кл/мм ³ cell/mm ³	%	кл/мм ³ cell/mm ³
CD45RA ⁺	44,37±3,98	996±96	42,42±3,99	910±98
CD45R0 ⁺	28,39±1,87	576±58	26,82±2,60	545±48
CD45RA ⁺ /CD45R0 ⁺	0,56±0,07	13±2	0,81±0,11	17±3
CD3 ⁺	68,84±3,64	1510±116	62,74±3,36	1318±96
CD3 ⁺ CD4 ⁺	43,30±2,53	959±87	36,35±2,42	757±60
CD3 ⁺ CD8 ⁺	19,46±1,83	425±34	17,30±1,71	370±41
CD19 ⁺	9,73±0,75	214±17	9,08±0,86	186±19
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺	12,15±1,78	267±41	11,53±1,12	246±29
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺	1,63±0,41	37±5	1,74±0,38	37±4

ТАБЛИЦА 3. СОПОСТАВЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ КАПИЛЛЯРНОЙ И ВЕНОЗНОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

TABLE 3. COMPARISON OF THE MAIN LYMPHOCYTE SUBSETS OF CAPILLARY AND VENOUS BLOOD IN PATIENTS WITH PSORIASIS

	Капилляр Capillary		Вена Vein	
	%	кл/мм ³ cell/mm ³	%	кл/мм ³ cell/mm ³
CD45RA ⁺	48,59±3,74	1048±90	41,81±3,05	869±78
CD45R0 ⁺	34,50±2,19*	762±64*	30,56±2,79	656±67
CD45RA ⁺ /CD45R0 ⁺	4,20±0,39*	113±22*	3,76±0,33*	74±15*
CD3 ⁺	61,97±2,64	1379±95	60,18±2,59	1290±95
CD3 ⁺ CD4 ⁺	38,59±2,23	858±76	35,22±2,03	756±68
CD3 ⁺ CD8 ⁺	18,93±1,25	419±36	18,23±1,40	389±41
CD19 ⁺	13,77±1,55*	306±26*	12,78±1,23*	259±23*
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺	14,08±1,37	296±41	12,99±1,11	281±39
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺	3,93±0,53*	98±6*	3,61±0,46*	57±11

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

Note. *, $p < 0.05$ compared to the group of healthy people.

капиллярной, так и в венозной крови, уровней дважды положительных лимфоцитов (CD45RA⁺/CD45R0⁺), В-лимфоцитов и NKT-лимфоцитов (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) как в процентном, так и в абсолютном выражении. Исключение составляет только абсолютный уровень NKT-лимфоцитов в венозной крови, для которых повышение уров-

ня было недостоверно. Следует также отметить значимое повышение ($p < 0,05$) в капиллярной крови клеток памяти (CD45R0⁺) в группе больных псориазом по сравнению со здоровыми как в процентном, так и в абсолютном выражении. В венозной крови такое повышение просматривается лишь как недостоверная тенденция.

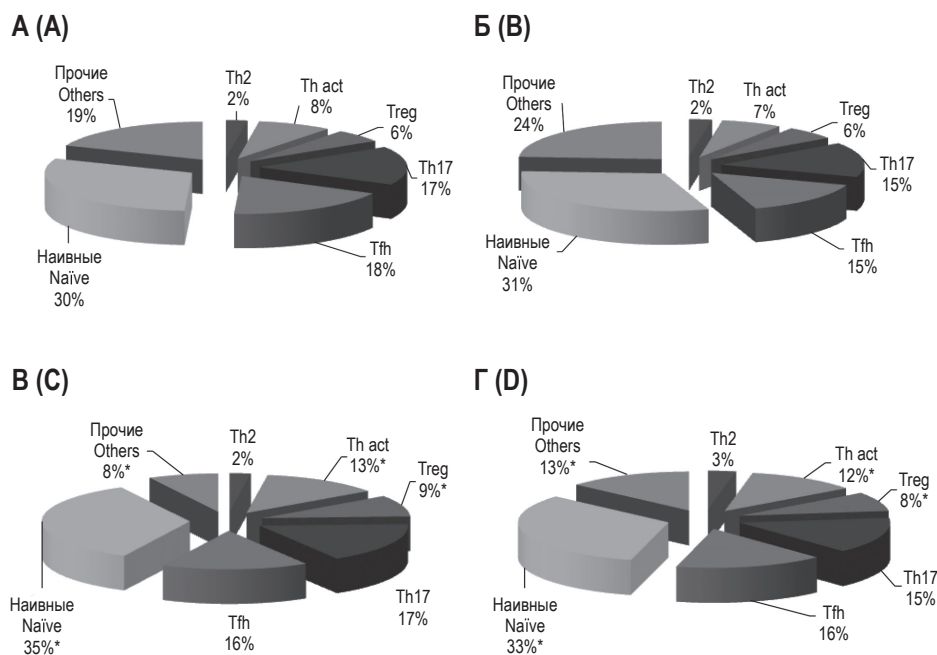


Рисунок 1. Субпопуляции CD3⁺CD4⁺T-лимфоцитов в периферической крови

Примечание. А – здоровые люди, капиллярная кровь. Б – здоровые люди, венозная кровь. В – больные псориазом, капиллярная кровь. Г – больные псориазом, венозная кровь.

* – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим здоровым контролем.

Figure 1. Subsets of CD3⁺CD4⁺T lymphocytes in peripheral blood

Note. A, healthy people, capillary blood. B, healthy people, venous blood. C, patients with psoriasis, capillary blood. D, patients with psoriasis, venous blood.

*, $p < 0.05$ compared to corresponding healthy controls.

На рисунке 1 представлено сопоставление субпопуляций CD3⁺CD4⁺T-лимфоцитов в капиллярной и венозной крови здоровых и больных псориазом людей. Сразу оговоримся, что мы имели возможность определять не все известные субпопуляции Т-хелперов. Так для субпопуляций Th1, Th9 и Th22 нет достоверных поверхностных маркеров, позволяющих их четко идентифицировать. Также, возможно, существуют еще неизвестные субпопуляции хелперов. Все эти не определявшиеся в нашем исследовании субпопуляции мы объединили в группу «Прочие». Группа «Прочие» представляет собой разницу между общим количеством CD3⁺CD4⁺T-лимфоцитов и суммой количества лимфоцитов в определявшихся нами субпопуляциях. Из рисунка видно, что нет значимых различий в субпопуляционном составе CD3⁺CD4⁺T-лимфоцитов в капиллярной и венозной крови здоровых людей. В то же время в капиллярной крови больных псориазом отмечается значимое повышение ($p < 0,05$) процента наивных (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺) Т-лимфоцитов, составивших $35,05 \pm 1,38\%$ по сравнению с $30,29 \pm 1,27\%$ контрольной группы, активиро-

ванных хелперов Th_{act} (CD25⁺CD127^{hi}CD4⁺), $13,29 \pm 0,92\%$ в группе псориаза и $8,14 \pm 0,81\%$ в контрольной группе и Т-регуляторных клеток Treg (CD25^{hi}CD127^{neg/lo}CD4⁺) $9,11 \pm 0,47\%$ и $5,58 \pm 0,56\%$ соответственно и снижение группы «Прочие» с $18,9\%$ у здоровых до $7,66\%$ у больных. В венозной крови псориазических больных выявлено значимое повышение Th_{act} до $11,9 \pm 0,93\%$ по сравнению с $6,89 \pm 0,87\%$ в контроле и Treg ($8,29 \pm 0,58\%$ и $5,8 \pm 0,47\%$, соответственно) и снижение группы «Прочие» с $23,99\%$ до $13,47\%$ ($p < 0,05$).

Субпопуляционный состав В-лимфоцитов отражен на рисунке 2. Интересно, что уровень CD27⁺CD19⁺В-клеток памяти (Bm) в капиллярной крови был значимо выше ($18,93 \pm 1,24\%$ в группе здоровых доноров и $20,01 \pm 1,85\%$ в группе больных псориазом), чем в венозной крови, $13,35 \pm 1,09\%$ и $14,88 \pm 1,18\%$, соответственно ($p < 0,05$). Важно, что в капиллярной крови больных псориазом было выявлено значимое ($p < 0,05$) повышение В1-клеток (CD5⁺CD19⁺) $13,27 \pm 1,23\%$ по сравнению с $8,21 \pm 0,96\%$ у здоровых и Breg (CD5⁺CD1d^{hi}CD19⁺) $10,37 \pm 1,41\%$ и

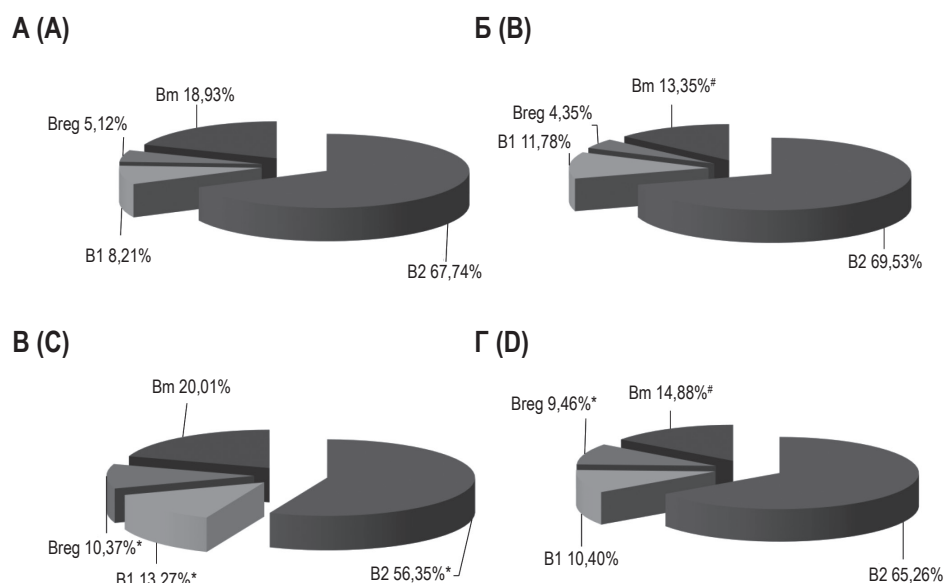


Рисунок 2. Субпопуляции В-лимфоцитов в периферической крови

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. B lymphocyte subsets in peripheral blood

Note. As for Figure 1.

5,12±0,41%, соответственно и значимое снижение В2-лимфоцитов с 67,74±3,23% у здоровых до 56,35±3,15% в группе больных. В то же время в венозной крови было обнаружено значимое повышение уровня только Breg с 4,35±0,52% в группе здоровых до 9,46±1,23% у больных ($p < 0,05$).

Кроме субпопуляций лимфоцитов, мы также оценили субпопуляционный состав моноцитов/макрофагов периферической крови. Результаты представлены на рисунке 3. Согласно принятым в мировой литературе критериям, мы выделяли 3 основных субпопуляции: M1 (классические) моноциты, несущие маркеры CD14^{hi}CD16^{lo}, M2 (не классические) моноциты CD14^{lo}CD16^{hi} и воспалительные моноциты (M_{infl}) CD14⁺CD16^{int}. Кроме того, было некоторое количество моноцитов, четко не попадавшие в эти группы, они были отнесены в группу «Прочие». Эта группа, как в капиллярной, так и в венозной крови здоровых и больных псориазом, составляла 10%. Различий в субпопуляционном составе моноцитов капиллярной и венозной крови здоровых доноров выявлено не было. В капиллярной крови больных псориазом обнаружено значимое ($p < 0,05$) повышение уровней неклассических M2 до 9,6±0,73% по сравнению с 7,24±0,67% у здоровых и воспалительных M_{infl} моноцитов 7,39±0,71% и 5,5±0,52% соответственно и снижение уровня классических M1-моноцитов с 77,65±1,92% у здоровых до 73,0±1,1,81% у больных ($p < 0,05$). В венозной

крови псориазных больных было выявлено только повышение воспалительных M_{infl} моноцитов с 3,68±0,56% у здоровых до 7,46±0,71% у больных псориазом ($p < 0,05$).

Результаты определения цитокинового профиля для групп здоровых и больных псориазом в плазме капиллярной и венозной крови представлены в таблице 4. Из таблицы видно, что в группе здоровых уровень цитокинов в капилляре немного превышает уровень соответствующих цитокинов в вене, но эти различия статистически незначимы. В то же время в группе больных псориазом уровень цитокинов в плазме крови значимо повышен ($p < 0,05$). На рисунке 4 представлено соотношение цитокинов в капилляре и вене у здоровых и псориазных больных. На рисунке четко видно, что в капиллярной крови уровни цитокинов больных псориазом значимо превышают уровни соответствующих цитокинов в группе здоровых ($p < 0,05$). Это превышение составляет от двух до нескольких десятков раз. Так, IL-1β в капиллярной крови больных псориазом превышает уровень здоровых в 37,4 раза. Выделяется из общей тенденции только IL-10, уровень которого в капилляре не различается в группах больных и здоровых (рис. 4А). В плазме венозной крови уровни большинства исследованных цитокинов в группе больных псориазом не отличались от группы здоровых. Исключение составили 4 цитокина: IL-4, IL-21, IL-23 и TNF, чьи уровни

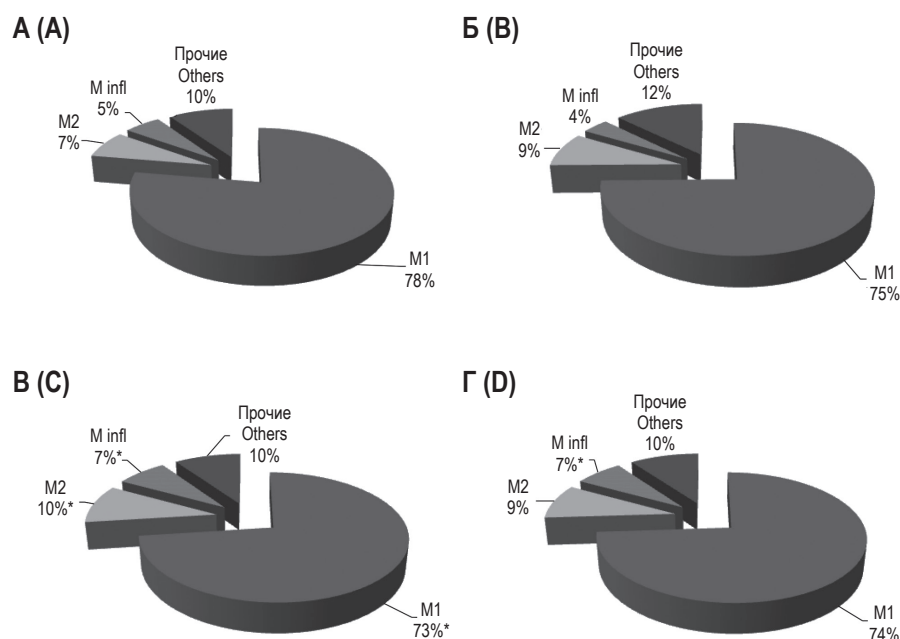


Рисунок 3. Субпопуляции моноцитов/макрофагов в периферической крови

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Monocytes / macrophages subsets in peripheral blood

Note. As for Figure 1.

ТАБЛИЦА 4. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ВЕНОЗНОЙ И КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ (пг/мл)

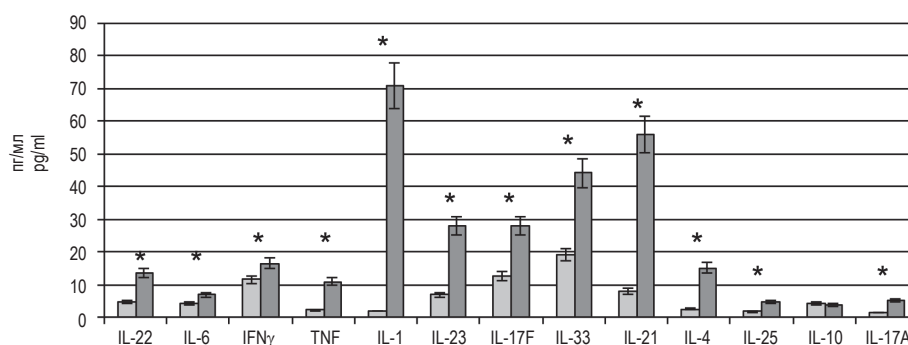
TABLE 4. CYTOKINE PROFILE OF VENOUS AND CAPILLARY BLOOD OF HEALTHY AND PATIENTS WITH PSORIASIS (pg/ml)

	Здоровые Healthy		Псориаз Psoriasis	
	Капилляр Capillary	Вена Vein	Капилляр Capillary	Вена Vein
IL-1 β	1,89 $\pm$ 0,21	1,39 $\pm$ 0,17	70,74 $\pm$ 7,99*#	1,43 $\pm$ 0,23
IL-4	2,53 $\pm$ 0,31	2,77 $\pm$ 0,35	15,07 $\pm$ 2,22*#	5,40 $\pm$ 0,83*
IL-6	4,13 $\pm$ 0,43	3,22 $\pm$ 0,33	6,97 $\pm$ 1,11*#	3,79 $\pm$ 0,58
IL-10	4,24 $\pm$ 0,53	2,13 $\pm$ 0,29	3,76 $\pm$ 0,56	1,81 $\pm$ 0,33
IL-17A	1,36 $\pm$ 0,17	1,02 $\pm$ 0,14	5,20 $\pm$ 0,86*#	0,60 $\pm$ 0,11
IL-17F	12,53 $\pm$ 1,53	11,97 $\pm$ 1,68	27,83 $\pm$ 2,81*#	10,95 $\pm$ 1,25
IL-21	7,99 $\pm$ 1,11	7,88 $\pm$ 0,99	55,90 $\pm$ 9,01*#	12,99 $\pm$ 2,11*
IL-22	4,52 $\pm$ 0,46	3,88 $\pm$ 0,37	13,73 $\pm$ 2,57*#	2,93 $\pm$ 0,54
IL-23	6,86 $\pm$ 0,89	7,35 $\pm$ 0,95	27,83 $\pm$ 4,09*#	9,65 $\pm$ 1,97*
IL-25	1,77 $\pm$ 0,23	1,11 $\pm$ 0,18	4,66 $\pm$ 0,89*#	1,12 $\pm$ 0,20
IL-33	19,20 $\pm$ 2,11	18,47 $\pm$ 2,18	44,18 $\pm$ 6,78*#	20,34 $\pm$ 3,66
IFN γ	11,60 $\pm$ 1,28	10,03 $\pm$ 1,17	16,52 $\pm$ 2,15*#	8,07 $\pm$ 1,04
TNF	2,12 $\pm$ 0,29	1,16 $\pm$ 0,19	10,85 $\pm$ 1,07*#	7,32 $\pm$ 0,96*

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим параметром группы здоровых, # – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим параметром в вене.

Note. *, $p < 0.05$ compared with the corresponding parameter in the group of healthy; #, $p < 0.05$ compared with the corresponding parameter in the vein.

А (А)



Б (В)

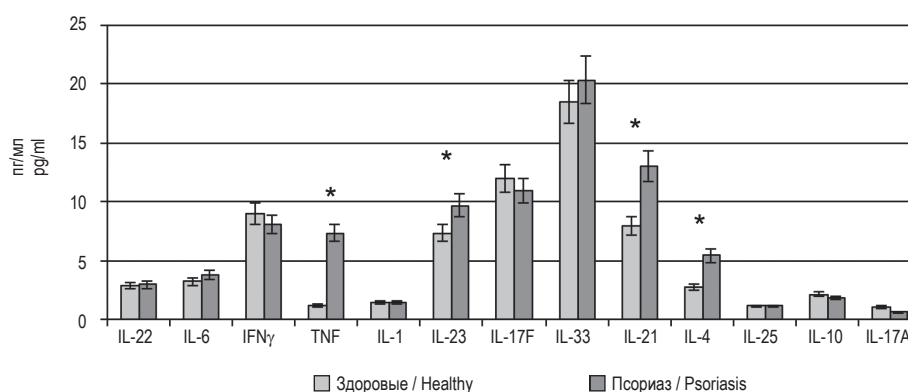


Рисунок 4. Цитокиновый профиль в плазме крови

Примечание. А – капиллярная кровь. Б – венозная кровь. * – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим здоровым контролем.

Figure 4. Plasma cytokine profile

Note. A, capillary blood. B, venous blood. *, $p < 0.05$ compared to corresponding healthy controls.

в группе больных значительно превышали, примерно в 2 раза, соответствующие уровни группы здоровых (рис. 4Б).

Обсуждение

В результате проведенных исследований было показано, что изменения в составе субпопуляций мононуклеаров капиллярной крови, взятой вблизи псориатического очага оказались более выражены, чем в венозной крови. Так были выявлены значимо повышенные уровни дважды положительных лимфоцитов ($CD45RA^+/CD45R0^+$) и В-лимфоцитов и в капиллярной, и венозной крови, а в капиллярной, кроме того, еще повышение уровня клеток памяти ($CD45R0^+$) и NKT-лимфоцитов. Эти данные хорошо коррелируют с исследованиями, в которых было показано, что NKT-клетки обильно присутствуют в псориатических бляшках в отличие от здоровой кожи, тогда как в периферическом венозном русле количество NKT-лимфоцитов у пациентов с псориазом значительно меньше и связано с активностью заболевания [34]. Также в венозной

крови больных псориазом выявляли повышенный уровень клеток памяти [19].

Считается, что ведущая роль в течении заболевания принадлежит Т-лимфоцитам. В группе больных псориазом отмечен существенный дисбаланс в субпопуляциях Т-клеток, что свидетельствует об активности в очаге воспаления кожи. Так повышенными оказались субпопуляции активированных хелперов Th_{act} , Treg, а сниженными группа «Прочие», в которую были отнесены Th1, Th9, Th22, поскольку для них нет достоверных поверхностных маркеров. При этом уровни субпопуляций Th2, Th17, Tfh значимо не различались. Ранее было показано, что относительно сбалансированные параметры иммунного статуса у больных псориазом свидетельствуют о том, что Treg контролируют воспалительный процесс, однако хронически рецидивирующее течение заболевания говорит о неспособности Treg подавить аутовоспаление [5, 14].

В-клеточное звено оказалось вовлеченным в процесс. Было обнаружено значимое повышение уровня В1- и Breg-клеток и снижение уровня В2-лимфоцитов в капиллярной крови и повышение

Breg в венозной крови. Роль В-лимфоцитов в патогенезе псориаза была ранее отмечена [24]. В1-клетки принимают активное участие в ликвидации погибших клеток организма, Breg снижают активность иммунного поражения кератиноцитов в очаге [27].

Исследование субпопуляций моноцитов выявило повышение M2-клеток и воспалительных макрофагов M_{infl} в капилляре и только M_{infl} в вене. Известно, что M2-клетки способствуют очищению от погибших клеток и восстановлению эпителия кожи. Ранее было показано, что моноциты/макрофаги вовлечены в патогенез псориаза [13, 29].

Согласно современным представлениям о патогенезе псориаза, активную роль в этом заболевании играют Th1, Th17 и Th22, но по разным причинам повышения уровней этих субпопуляций выявлено не было. Однако количество еще не говорит об активности функций клеток. Нами были исследованы ключевые цитокины для разных субпопуляций лимфоцитов, а также про- и противовоспалительные цитокины. Как и в случае с субпопуляционным составом, в капиллярной крови больных псориазом изменения коснулись большего числа цитокинов, и эти различия были сильнее выражены, чем в венозной крови. Так в капиллярной крови обнаружено значимое повышение уровней IFN γ (ключевой цитокин Th1), IL-4 (маркер Th2), IL-17A (маркер Th17) и IL-23, способствующего Th17-типу ответа, IL-21 (ключевой цитокин Tfh), IL-22 (маркер Th22). В венозной крови было обнаружено значимое повышение только IL-4, IL-21 и IL-23. Можно заключить, что практически все известные субпопуляции Т-хелперов активированы и принимают участие в патогенезе псориаза. Эти данные хорошо коррелируют с работами зарубежных ученых, в которых было также показано участие этих субпопуляций/цитокинов в поддержании воспаления в псориатической бляшке [12, 20, 30, 31]. Важно, что, несмотря на повышение количества Treg как в капиллярной, так и в венозной крови у псориатических больных, не выявлено повышения уровня их главного цитокина IL-10. Это подтверждает высказанную ранее мысль о

несостоятельности контроля аутовоспаления при псориазе [5, 14].

При анализе провоспалительных цитокинов в капиллярной крови больных псориазом выявлено значимое повышение уровней таких цитокинов, как IL-1 β , IL-6 и TNF, в венозной крови — только TNF. Эти данные свидетельствуют о поддержании хронического воспаления в псориатическом очаге и хорошо коррелируют с ранее описанными результатами [18, 36]. В капиллярной крови были обнаружены также повышенные уровни IL-25 и IL-33, эти цитокины выделяются кератиноцитами и являются аларминами, сигналами повреждения эпителиальных клеток, запускающими воспалительный процесс, и IL-17F, который регулирует репарацию эпителия.

Таким образом, из проведенных исследований можно сделать 2 важных практических вывода. Во-первых, субпопуляционный состав мононуклеаров и цитокиновый профиль капиллярной и венозной крови здоровых людей значимо не различаются. Следовательно, в случае необходимости, можно использовать как капиллярную, так и венозную кровь для проведения таких анализов. Особенно это актуально при работе с маленькими детьми, для которых любое взятие крови является еще и серьезной психотравмой. А у новорожденных, особенно недоношенных, взятие венозной крови является непростой задачей. Во-вторых, предложенный нами метод определения субпопуляционного состава мононуклеаров и профиля цитокинов капиллярной крови из зоны псориатического поражения можно использовать для мониторинга местного иммунитета у больных псориазом. Он существенно менее травматичный, чем метод кожного окна и более информативный, чем исследование венозной крови. Выявленные отклонения в субпопуляционном составе мононуклеаров и цитокинового профиля капиллярной крови из зоны псориатического воспаления отражают особенности иммунопатогенеза псориаза на местном уровне и хорошо коррелируют с ранее описанными характеристиками аутовоспаления в псориатической бляшке.

Список литературы / References

1. Сенникова С.В., Топтыгина А.П. Семейство интерлейкина 36 как новый регулятор воспалительного ответа в барьерных тканях // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С.49-60. [Sennikova S.V., Topotygina A.P. Interleukin-36 family as a novel regulator of inflammation in the barrier tissues. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 49-60. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IFA-1880.
2. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточ-

ных цитофлюориметров-анализаторов» (Проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology "Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers" (Draft). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)] doi: 10/15789/1563-0625-2012-3-255-268.

3. Batycka-Baran A., Maj J., Wolf R., Szepietowski J.C. The new insight into the role of antimicrobial proteins-alarmins in the immunopathogenesis of psoriasis. *J. Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2014, e.628289. doi: 10.1155/2014/628289.

4. Boehncke W.H., Schön M.P. Psoriasis. *Lancet*, 2015, Vol. 386, no. 9997, pp. 983-994.

5. Buckner J.H. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 12, pp. 849-859.

6. Buchau A.S., Gallo R.L. Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clin. Dermatol.*, 2007, Vol. 25, no. 6, pp. 616-624.

7. Carrier Y., Ma H.L., Ramon H.E., Napierata L., Small C., O'Toole M., Young D.A., Fouser L.A., Nickerson-Nutter C., Collins M., Dunussi-Joannopoulos K., Medley Q.G. Inter-regulation of th17 cytokines and the il-36 cytokines *in vitro* and *in vivo*: Implications in psoriasis pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, 2011, Vol. 131, no. 12, pp. 2428-2437.

8. Chiricozzi A., Romanelli P., Volpe E., Borsellino G., Romanelli M. Scanning the immunopathogenesis of psoriasis. *Int. J. Mol.Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 1, 179. doi: 10.3390/ijms19010179.

9. Davidson A., Diamond B. Autoimmune diseases. *N. Engl. J. Med.*, 2001, Vol. 345, no. 5, pp. 340-350.

10. di Marco M., Schuster H., Backert L., Ghosh M., Rammensee H.G., Stevanovic S. Unveiling the peptide motifs of HLA-C and HLA-G from naturally presented peptides and generation of binding prediction matrices. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 199, no. 8, pp. 2639-2651.

11. Elias P.M., Arbiser J., Brown B.E., Rossiter H., Man M.Q., Cerimele F., Crumrine D., Gunathilake R., Choi E.H., Uchida Y., Tschachler E., Feingold K.R. Epidermal vascular endothelial growth factor production is required for permeability barrier homeostasis, dermal angiogenesis, and the development of epidermal hyperplasia: implications for the pathogenesis of psoriasis. *Am. J. Pathol.*, 2008, Vol. 173, no. 3, pp. 689-699.

12. Fitch E., Harper E., Skorcheva I., Kurtz S.E., Blauvelt A. Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2007, Vol. 9, no. 6, pp. 461-467.

13. Garcia-Rodriguez S., Arias-Santiago S., Perandrés-López R., Castellote L., Zumaquero E., Navarro P., Buendía-Eisman A., Ruiz J-C., Orgaz-Molina J., Sancho J., Zubiaur M. Increased gene expression of Toll-like receptor 4 on peripheral blood mononuclear cells in patients with psoriasis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2013, Vol. 27, no. 2, pp. 242-250.

14. Goodman W.A., Cooper K.D., McCormick T.S. Regulation generation: the suppressive functions of human regulatory T cells. *Crit. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 32, no. 1, pp. 65-79.

15. González-Parra S., Daudén E. Psoriasis and Depression: The Role of Inflammation. *Actas Dermo-sifiliogr (Engl Ed.)*, 2019, Vol. 110, no. 1, pp. 12-19.

16. Gregorio J., Meller S., Conrad C., Di Nardo A., Homey B., Lauerma A., Arai N., Gallo R.L., Digiovanni J., Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J. Exp. Med.*, 2010, Vol. 207, no. 13, pp. 2921-2930.

17. Gladman D. D., Antoni C., Mease P., Clegg D.O., Nash, P. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Ann. Rheum Dis.*, 2005, Vol. 64, Suppl. 2, pp. ii14-ii17.

18. Gottlieb A.B., Chamian F., Masud S., Cardinale I., Abello M.V., Lowes M.A., Chen F., Magliocco M., Krueger J.G. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 4, pp. 2721-2729.

19. Hegyi Z., Zwicker S., Bureik D., Peric M., Koglin S., Batycka-Baran A., Prinz J. C., Ruzicka T., Schaubert J., Wolf R. Vitamin D analog calcipotriol suppresses the Th17 cytokine-induced proinflammatory S100 "alarmins" psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 2012, Vol. 132, no. 5, pp. 1416-1424.

20. Katayama H. Development of psoriasis by continuous neutrophil infiltration into the epidermis. *Exp. Dermatol.*, 2018, Vol. 27, no. 10, pp. 1084-1091.

21. Langley R.G.B., Krueger G.G., Griffiths C.E.M. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, Vol. 64, Suppl. 2, pp. 18-23.

22. Lee E.B., Wu K.K., Lee M.P., Bhutani T., Wu J.J. Psoriasis risk factors and triggers. *Cutis*, 2018, Vol. 102, no. 5S, pp. 18-20.

23. Lowes M.A., Kikuchi T., Fuentes-Duculan J., Cardinale I., Zaba L.C., Haider A.S., P Bowman E.M., Krueger J.G. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J. Invest. Dermatol.*, 2008, Vol. 128, no. 5, pp. 1207-1211.

24. Lu J., Ding Y., Yi X., Zheng J. CD19⁺ B cell subsets in the peripheral blood and skin lesions of psoriasis patients and their correlations with disease severity. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2016, Vol. 49, no. 9, e5374. doi: 10.1590/1414-431X20165374.

25. Man X.Y., Yang X.H., Cai S.Q., Bu Z.Y., Zheng M. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on keratinocytes in psoriasis: regulated by calcium independent of VEGF. *J. Cell. Mol. Med.*, 2008, Vol. 12, no. 2, pp. 649-660.
26. Mattei P.L., Corey K.C., Kimball A.B. Psoriasis Area Severity Index (PASI) and the Dermatology Life Quality Index (DLQI): the correlation between disease severity and psychological burden in patients treated with biological therapies. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2014, Vol. 28, no. 3, pp. 333-337.
27. Matsushita T. Regulatory and effector B cells: Friends or foes? *J. Dermatol. Sci.*, 2019, Vol. 93, no. 1, pp. 2-7.
28. Nestle F.O., Conrad C., Tun-Kyi A., Homey B., Gombert M., Boyman O., Burg G., Liu Y.J., Gilliet M. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 202, no. 1, pp. 135-143.
29. Pochernina V.V., Daschuk A.M. TLR expression on peripheral blood monocytes in patients with psoriasis. *Wiad Lek.*, 2020, Vol. 73, no. 2, pp. 401-404.
30. Piskin G., Sylva-Steenland R.M.R., Bos J.D., Teunissen M.B.M. *In vitro* and *in situ* expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 3, pp. 1908-1915.
31. Santini S.M., Lapenta C., Donati S., Spadaro F., Belardelli F., Ferrantini M. Interferon- α -conditioned human monocytes combine a TH1-orienting attitude with the induction of autologous TH17 responses: role of IL-23 and IL-12. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 2, e17364. doi: 10.1371/journal.pone.0017364.
32. Schadler E.D., Ortel B., Mehrlis S.L. Biologics for the primary care physician: Review and treatment of psoriasis. *Dis. Mon.*, 2019, Vol. 65, no. 3, pp. 51-90.
33. Tauber M., Bal E., Pei X.-Y., Madrange M., Khelil A., Sahel H., Zenati A., Makrelouf M., Boubridaa K., Chiali A., Smahi N., Otsmane F., Bouajar B., Marrakchi S., Turki H., Bourrat E., Viguier M., Hamel Y., Bachelez H., Smahi A. IL36RN Mutations Affect Protein Expression and Function: A Basis for Genotype-Phenotype Correlation in Pustular Diseases. *J. Invest. Dermatol.*, 2016, Vol. 136, no. 9, pp. 1811-1819.
34. van der Vliet H.J., von Blomberg B.M., Nishi N., Reijm M., Voskuyl A.E., van Bodegraven A.A., Polman C.H., Rustemeyer T., Lips P., van den Eertwegh A. J., Giaccone G., Scheper R.J., Pinedo H.M. Circulating Va24⁺ Vb11⁺ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin. Immunol.*, 2001, Vol. 100, no. 2, pp. 144-148.
35. Wanga A., Bai Y.P. Dendritic cells: The driver of psoriasis. *J. Dermatol.*, 2020, Vol. 47, no. 2, pp. 104-113.
36. Wang C.Q.F., Akalu Y.T., Suarez-Farinas M., Gonzalez J., Mitsui H., Lowes M.A., Orlow S.J., Manga P., Krueger J.G. IL-17 and TNF synergistically modulate cytokine expression while suppressing melanogenesis: potential relevance to psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 2013, Vol. 133, no. 12, pp. 2741-2752.
37. World Health Organization. Global report on psoriasis. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204417> (last accessed 20 July 2021).
38. Young H.S., Summers A.M., Bhushan M., Brenchley P.E.C., Griffiths C.E.M. Single-nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor in psoriasis of early onset. *J. Invest. Dermatol.*, 2004, Vol. 122, no. 1, pp. 209-215.
39. Zheng Y., Danilenko D.M., Valdez P., Kasman I., Eastham-Anderson J., Wu J., Ouyang W. Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, 2007, Vol. 445, no. 7128, pp. 648-651.

Авторы:

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

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

Authors:

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

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

Семикина Е.Л. — д.м.н., главный научный сотрудник, заведующая централизованной клинко-диагностической лабораторией ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии № 1 ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Закиров Р.Ш. — врач клинической лабораторной диагностики централизованной клинко-диагностической лаборатории ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Акулова С.С. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head, Central Diagnostic Laboratory, Federal State Autonomous Institution "National Medical Research Center of Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation; Professor, Department of Pediatrics No. 1, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Zakirov R.Sh., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Centralized Diagnostic Laboratory, Federal State Autonomous Institution "National Medical Research Center of Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Akulova S.S., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory for Experimental Immunology and Virology, Federal State Autonomous Institution "National Medical Research Center of Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.07.2021
Принята к печати 29.09.2021

Received 29.07.2021
Accepted 29.09.2021

ОСОБЕННОСТИ СПЕКТРА ЦИТОКИНОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕ

Оспельникова Т.П.¹, Денисов А.А.², Черевко Н.А.^{2,3}, Кузьмина В.В.¹,
Дмитрук В.С.², Нагайцева Д.С.³, Каргов И.С.⁴

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

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

³ МО «Центр Семейной Медицины», г. Томск, Россия

⁴ Bio-Rad Laboratories, Москва, Россия

Резюме. Крапивница представляет собой серьезную медико-социальную проблему в связи с высокой распространенностью, отсутствием унифицированных подходов к диагностике и лечению, с большими финансовыми затратами на терапию и реабилитацию. Длительное рецидивирующее течение болезни, резистентность к традиционным методам терапии приводят к существенному снижению качества жизни больных хронической крапивницей: зуд, сопровождающий данное заболевание, приводит к ухудшению общего самочувствия пациента, часто нарушению сна и, как следствие, значительному снижению работоспособности. Этиопатогенез крапивницы является до настоящего времени сложной задачей в связи с многовекторностью цитокинового ответа, участия белков системы комплемента, особенностей кинин-брадикининного участия, особой экспрессии генов иммунного ответа. Проблемой современной популяции является ожирение — хроническое, гетерогенное, цитокин-опосредованное, прогрессирующее воспалительное заболевание, характеризующееся избыточным накоплением жировой ткани. Жировая ткань, как отдельный орган эндокринной системы, продуцирует множество гормоноподобных веществ, медиаторов, цитокинов и хемокинов, они получили общее наименование адипокины или адипоцитокينات. В проведенном исследовании установлены достоверные признаки деструктивных изменений паренхимы печени в виде увеличения билирубина и АСТ, снижение уровня витамина D у пациентов с ХРК на фоне ожирения. Действие цитокинов, как медиаторов межклеточного взаимодействия, тесно связано с физиологическими и патофизиологическими реакциями организма с модуляцией как локальных, так и системных механизмов защиты. Предполагается, что в цитокиновом статусе пациентов с хронической крапивницей преобладают цитокины, усиливающие аллергическое воспаление кожи. Анализ концентрации 12 Т-регуляторных биомаркеров выявил повышенные концентрации IL-10, IL-19, IL-20, IL-27, IL-35, IFN λ 2 и IFN λ 1 в сыворотках крови пациентов с хронической крапивницей. Установлено, что в группе пациентов с хронической крапивницей и с повышенным индексом массы тела (ИМТ) уровень всех исследованных Т-регуляторных цитокинов ниже по сравнению с группой пациентов, у которых ИМТ в норме,

Адрес для переписки:

Оспельникова Татьяна Петровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (903) 521-32-60.
E-mail: ospelnikovat@mail.ru

Address for correspondence:

Ospelnikova Tatiana P.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow,
Malyy Kazennyy lane, 5a.
Phone: 7 (903) 521-32-60.
E-mail: ospelnikovat@mail.ru

Образец цитирования:

Т.П. Оспельникова, А.А. Денисов, Н.А. Черевко,
В.В. Кузьмина, В.С. Дмитрук, Д.С. Нагайцева,
И.С. Каргов «Особенности спектра цитокинов при
хронической крапивнице» // Медицинская иммунология,
2021. Т. 23, № 6. С. 1347-1356.
doi: 10.15789/1563-0625-FOC-2332

© Оспельникова Т.П. и соавт., 2021

For citation:

T.P. Ospelnikova., A.A. Denisov, N.A. Cherevko,
V.V. Kuzmina, V.S. Dmitruk, D.S. Nagaitseva, I.S. Kargov
“Features of cytokine spectrum in chronic urticaria”, Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021,
Vol. 23, no. 6, pp. 1347-1356.
doi: 10.15789/1563-0625-FOC-2332

DOI: 10.15789/1563-0625-FOC-2332

за исключением IL-10. Выявлены сниженные уровни содержания биологически активных IFN I (α/β) и особенно IFN II (γ) типов лейкоцитами крови пациентов с хронической крапивницей. Получены данные об уровнях 12 Treg-цитокинов в сыворотке крови пациентов с ХК с выявленной тенденцией к дисбалансу Treg-цитокинов: IL-10, IL-19, IL-20, IL-27, IL-35, IFN λ 2 и IFN λ 1.

Ключевые слова: аллергическое заболевание, хроническая крапивница, биомаркеры, регуляторные цитокины, интерфероны, ожирение

FEATURES OF CYTOKINE SPECTRUM IN CHRONIC URTICARIA

Ospelnikova T.P.^a, Denisov A.A.^b, Cherevko N.A.^{b, c}, Kuzmina V.V.^a,
Dmitruk V.S.^b, Nagaitseva D.S.^c, Kargov I.S.^d

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

^b Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

^c Center of Family Medicine, Tomsk, Russian Federation

^d Bio-Rad Laboratories, Moscow, Russian Federation

Abstract. Urticaria is a serious medical and social problem due to its high prevalence, lack of unified approaches to diagnosis and treatment, with high financial costs for therapy and rehabilitation. Long-term recurrent course of the disease, resistance to traditional methods of therapy lead to a significant decrease in the quality of life of patients with chronic urticaria. Itching accompanying this disease leads to deterioration in the patient's general well-being, frequent sleep disturbances and, as a result, significant decrease in working capacity. Up to the present moment, etiopathogenesis of urticaria is a complex challenge due to the multi-vector nature of cytokine response, interference of proteases of the complement system, patterns of kinin-bradykinin interference, peculiar expression of the immune response. The problem of current population is lipotrophy — chronic, heterogeneous, cytokine mediating, progressive inflammatory disease attributed by abnormal accumulation of excessive adipose tissue. Adipose tissue, being a sporadic organ of endocrine system secretes multiple hormone-like substances, mediators, cytokines and chemokines which have been given a common name, i.e., adipokines or adipocytokines. True signs of destructive parenchymal changes of liver in the form of increasing bilirubin and AST, decreasing level of vitamin D in patients with chronic recurrent urticaria in presence of obesity have been revealed during the study performed. The action of cytokines, as mediators of intercellular interaction is closely related to the physiological and pathophysiological responses of the body with modulation of both local and systemic defense mechanisms. It is assumed that the cytokine status of patients with chronic urticaria is dominated by cytokines that increase allergic inflammation of the skin. Analysis of 12 T regulatory biomarker concentrations revealed increased concentrations of IL-10, IL-19, IL-20, IL-27, IL-35, IFN λ 2 and IFN λ 1 in blood serum of patients with chronic urticaria. It was found that in the group of patients with chronic urticaria and increased body mass index (BMI), the level of all investigated T regulatory cytokines is lower than in the patients with normal BMI, except for IL-10. Decreased levels of biologically active IFN I (α/β) and, especially, IFN II (γ) types of blood leukocytes in patients with chronic urticaria were revealed. The levels of 12 Treg cytokines were determined in blood serum of patients with chronic urticaria, showing trend for imbalance of Treg cytokines: IL-10, IL-19, IL-20, IL-27, IL-35, IFN λ 2 and IFN λ 1.

Keywords: allergic disorder, chronic urticaria, biomarkers, regulatory cytokines, interferon, obesity

Введение

Крапивница является распространенным заболеванием: различные ее клинические варианты диагностируются у 15-25% людей в популяции, при этом четверть случаев приходится на хроническую крапивницу (ХК). Продолжительность заболевания у взрослых лиц составляет в среднем от 3 до 5 лет, при этом каждый пятый пациент с ХК отмечает появление волдырей на протяжении

более длительного периода (до 20 лет). Кроме того, у каждого второго пациента с крапивницей регистрируется такое опасное для жизни состояние, как ангиоотек.

Клинически крапивница проявляется волдырями, которые не имеют характерной локализации и сопровождаются зудом, реже — жжением. Волдыри могут иметь тенденцию к слиянию в местах наибольшего трения одеждой или частей

тела друг о друга (ягодицы, поясничная область, плечи, бедра). На лице элементы могут практически не выступать над уровнем кожи. В ряде случаев высыпания захватывают практически весь кожный покров и могут сопровождаться повышением температуры тела. Волдыри имеют сначала бледно-розовый цвет за счет локального расширения поверхностной сети кровеносных сосудов дермы (*urticaria rubra*), а затем, по мере нарастания отека в соединительной ткани и сдавления сети мелких сосудов, они могут приобретать фарфорово-белый цвет (*urticaria alba, seu porcellanea*). При уменьшении выраженности отека волдыри постепенно становятся розового цвета, а затем исчезают бесследно.

Хроническая крапивница характеризуется возникновением на коже зудящих волдырей на протяжении более 6 недель, представляющие собой хорошо очерченные области отека без изъязвлений с осветленными центрами и выпуклыми границами, которые охватывают только поверхностные участки дермы и наблюдаются в сочетании с окружающей эритемой кожи [12].

Повреждения достигают нескольких миллиметров в диаметре, но могут объединяться, образуя волдыри шириной до нескольких сантиметров. Крапивница также может сопровождаться наличием ангионевротического отека, который возникает на подслизистых поверхностях верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и более глубоких слоях кожи, включая подкожную клетчатку [9].

Крапивница может быть разделена на две группы на основе ее клинических проявлений: острая форма, которая длится менее шести недель и часто является аллергической, и хроническая спонтанная крапивница (ХСК) [8]. Ранее называемая хронической идиопатической крапивницей, ХСК относится к рецидивирующей крапивнице, длящейся более 6 недель и возникающей в отсутствие идентифицируемого триггера. Крапивница, которая вызывается четко определенным вызывающим фактором (например давлением, температурой, вибрацией), называется индуцибельной крапивницей [5].

Крапивница представляет собой серьезную социальную проблему в связи с высокой распространенностью, отсутствием унифицированных подходов к диагностике и лечению с большими финансовыми затратами на терапию и реабилитацию. Длительное течение болезни с распространенным заболеванием кожи, резистентность к традиционным методам терапии приводят к серьезному снижению качества жизни больных ХК. Действие цитокинов, как медиаторов межклеточного взаимодействия, тесно связано с физиологическими и патофизиологическими ре-

акциями организма с модуляцией как локальных, так и системных механизмов защиты. Предполагается, что в цитокиновом статусе пациентов с ХК преобладают цитокины, усиливающие аллергическое воспаление кожи.

Изучение крапивницы является одной из актуальных задач современной аллергологии [1].

Материалы и методы

На базе медицинского объединения ООО «Центр Семейной медицины» г. Томска с 2019 по 2020 г. был обследован 21 пациент с диагнозом «L50.1. Хроническая идиопатическая крапивница» в возрасте от 21 года до 53 лет (среднее $36,4 \pm 3,4$ года), в том числе 6 мужчин и 15 женщин. Длительность заболевания составляла от 6 месяцев до 12 лет (в среднем по группе $4,2 \pm 1,6$ года). У всех пациентов отмечалось часто рецидивирующее течение крапивницы (более 4 обострений в год; в среднем $5,3 \pm 0,9$ раза в год).

Критерии включения в исследование:

- 1) возраст старше 18 лет;
- 2) хроническое непрерывное течение крапивницы.

Критерии исключения из исследования:

- 1) крапивница с установленной причиной инфекционного, аллергического, лекарственного или физического характера;
- 2) гистологически подтвержденный уртикарный васкулит;
- 3) лечение антигистаминными препаратами, глюкокортикостероидами, циклоспорином или метотрексатом в момент начала исследования или в течение последнего месяца перед исследованием;
- 4) нежелание участвовать в исследовании.

Материалом для исследования служила кровь взрослых людей ($n = 31$) (с информированным согласием). В 1-ю группу входили пациенты с диагнозом «ХК» в анамнезе ($n = 21$). 2-ю группу (группу сравнения) составляли практически здоровые волонтеры ($n = 10$). Кровь у добровольцев двух групп отбирали из локтевой вены. Кроме того, гепаринизированную кровь исследовали на определение биологической активности интерферонов (IFN) лейкоцитами крови.

Были использованы следующие методы лабораторных исследований пациентов и добровольцев: общий анализ крови, определение концентрации витамина D — 25(OH)D, биохимический анализ крови, измерение индекса массы тела (ИМТ). Стандартные методики исследования проведены на базе лаборатории ООО «Центра Семейной медицины».

Измерение уровней белков цитокинов проводили методами иммуноферментного анализа (ИФА), мультиплексного иммунофлуоресцент-

ного анализа; биологическую активность IFN лейкоцитами крови оценивали культурально-биологическим методом («Интерфероновый статус») в лаборатории интерферонов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

С помощью метода ИФА определяли уровни белков IFN α и IFN γ в сыворотке крови по прилагаемым инструкциям в наборе. Методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на магнитных микросферах на анализаторе MAGPIX (BioRad, США) в сыворотке крови определяли концентрации 12 Т-регуляторных цитокинов (интерлейкин IL-2, IL-10, IL-12 p40, IL-12 p70, IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, IL-27, IL-28A/IFN λ 2, IL-29/IFN λ 1, IL-35) при использовании набора Bio-Plex Pro™ Human Treg Panel 12-plex. Принцип Bio-Plex Pro Assay (Bio-Rad) аналогичен принципу сэндвич-структуры иммуоферментного анализа, отформатированного для использования с магнитными микросферами. Выражаем благодарность НИИВС им. И.И. Мечникова за предоставление набора Bio-Plex Pro™ Human Treg Panel 12-plex производства Bio-Rad.

Метод «Интерфероновый статус» включает определение в крови пациентов уровней индуцированной продукции IFN I, II типов и циркулирующего (сывороточного) IFN. Биологическая функциональная активность IFN оценивается в чувствительной к IFN клеточной культуре при использовании тест-вируса [4].

Результаты

Т-регуляторные цитокины

Методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа в сыворотке крови определяли концентрации 12 биомаркеров (IL-2, IL-10, IL-12 p40, IL-12 p70, IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, IL-27, IL-28A/IFN λ 2, IL-29/IFN λ 1, IL-35), уровни которых отражены на рисунках 1 и 2.

В сыворотке крови пациентов с ХК и практически здоровых не выявлены белки IFN I (α) и II (γ) типов, однако, выявлены IFN III (λ) типа. Так, наличие IFN λ 2 выявлено в сыворотке крови у 6 пациентов ХК (28,6%) и, особенно, IFN λ 1 (85,7%) – в сыворотках 18 из 21 пациента. Показана тенденция к повышению в сыворотке крови уровней IL-2 (19%), IL-10 (28,6%), IL-12 (28,6%), IL-19 (66,7%), IL-20 (62%), IL-22 (23,8%), IL-26 (14,3%), IL-27 (14,3%), IL-35 (23,8%) у пациентов с ХК. Следует отметить значительно повышенные концентрации белков Трег цитокинов в сыворотке крови 3 пациентов.

Методом ИФА были исследованы уровни IFN α и IFN γ в сыворотке крови пациентов с ХК, группы с ХК и ожирением и здоровых доноров, показатели которых в перечисленных группах не отличались и составляли 0 пг/мл.

По данным из анамнеза пациентов с ХК 29% пациентов на момент сдачи анализа имели недомогание в виде кашля, 10% переболели ОРВИ за 2 недели до сдачи теста. В группе практически здоровых волонтеров 20% человек имели недомо-

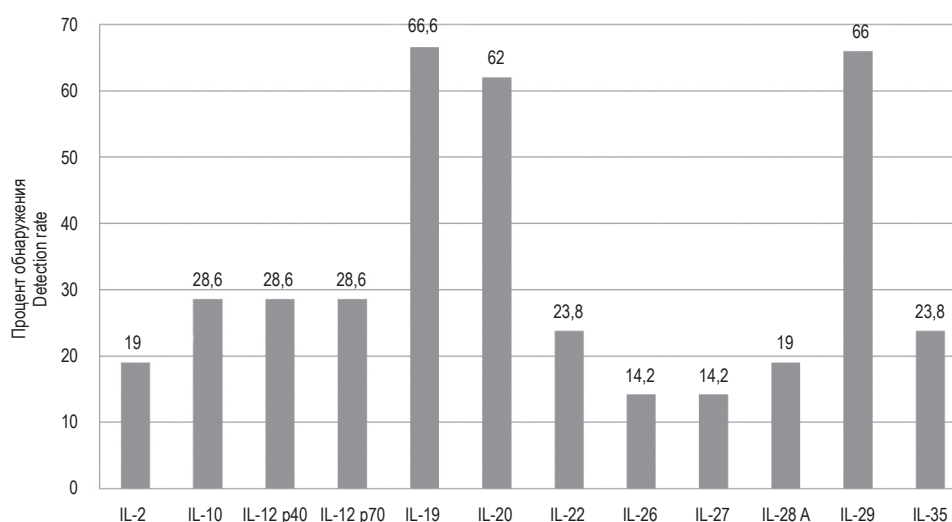


Рисунок 1. Уровень Т-регуляторных цитокинов (%) у пациентов с хронической крапивницей

Figure 1. Level of T regulatory cytokines (%) in patients with chronic urticaria

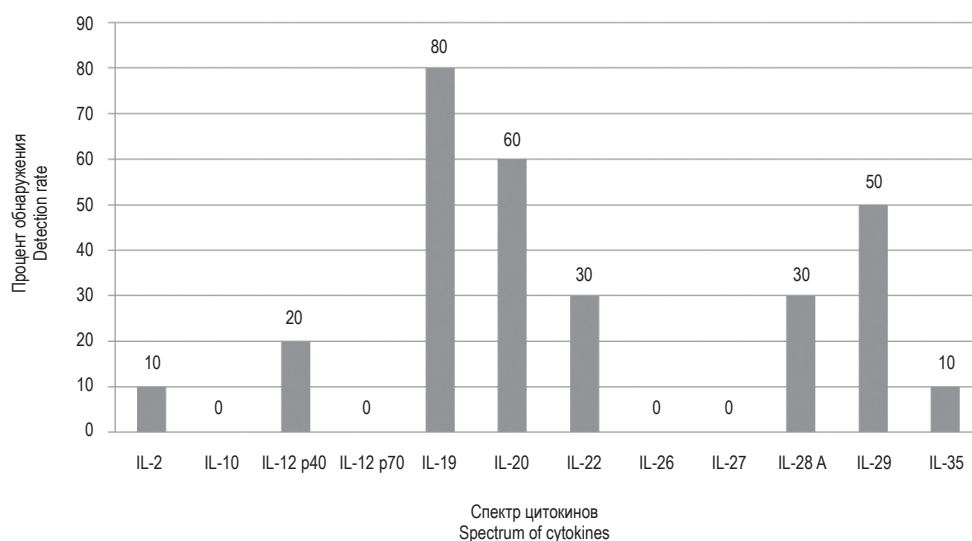


Рисунок 2. Уровень Т-регуляторных цитокинов (%) условно здоровых доноров

Figure 2. Level of T regulatory cytokines (%) of apparently healthy donors

гание (кашель, насморк) на момент сдачи теста; 33% пациентов с ХК и 40% практически здоровых волонтеров имеют в анамнезе хронический гастрит: 4 человека в группе контроля условно здоровых доноров и 7 пациентов с ХК. Такие факторы могут оказывать существенные изменения на результат анализа, как видно по данным на гистограммах (рис. 1, 2).

Общий метаболический синдром и ХК

В ходе исследования было выяснено, что у трети пациентов с ХК повышен индекс массы тела (ИМТ), что также отражается на результатах анализов.

Исходя из полученных новых данных, мы разделили группу пациентов с ХК на две подгруппы в соответствии с ИМТ: в первую подгруппу внесли данные пациентов с ХК, ИМТ которых в

норме ($n = 14$), $ИМТ 18,5 < ИМТ < 25$; вторую подгруппу составляли пациенты с ХК и ожирением ($n = 7$), $ИМТ > 27$, и сравнили данные по цитокинам, результаты которых представлены в таблице 1.

ИМТ в двух группах измеряли по формуле: $I = m/h^2$

m — масса тела в килограммах

h — рост в метрах, измеряется в $кг/м^2$.

По данным гистограммы на рисунке 3, у пациентов с ХК и повышенным ИМТ уровень всех исследованных Т-регуляторных цитокинов ниже по сравнению с группой пациентов с нормальным ИМТ, за исключением IL-10.

Нами получены данные, отличные от результатов ранее приведенных исследований [11]: исходя из результатов, представленных в таблице 2

ТАБЛИЦА 1. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ (пг/мл) У ПАЦИЕНТОВ С ИМТ В НОРМЕ И ВЫШЕ НОРМЫ

TABLE 1. CYTOKINE PROFILE (pg/ml) IN PATIENTS WITH NORMAL AND HIGHER BMI

	IL-2	IL-10	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-19	IL-20	IL-22	IL-26	IL-27	IL-28	IL-29	IL-35
ИМТ BMI (N)	21	21	36	36	79	64	36	21	22	43	86	36
ИМТ BMI (> N)	14	29	14	14	43	57	14	0	0	0	57	0

Примечание. ИМТ — индекс массы тела.

Note. BMI, body mass index.

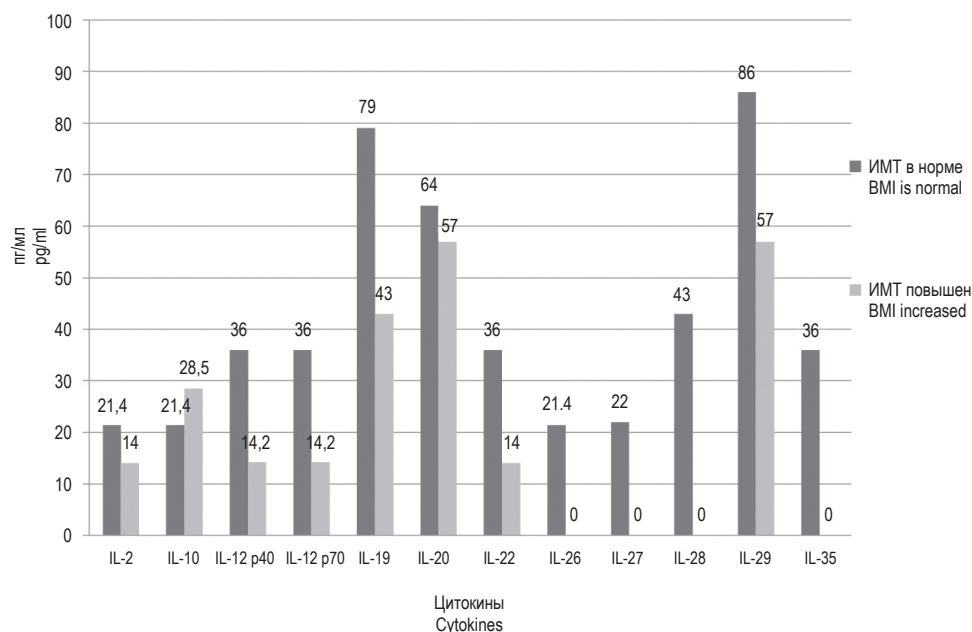


Рисунок 3. Уровень цитокинов пациентов с индексом массы тела в норме и выше нормы

Figure 3. Cytokine levels in chronic urticarial patients with normal and higher body mass index

и рисунке 3 относительно уровня цитокинов, показано, что между двумя подгруппами пациентов с ХК и разным ИМТ существует корреляция (коэффициент корреляции данных показателей $r = 0,8$).

По данным из таблицы 2, у пациентов с ХК и ожирением видно, что 42,8% имеют уровень глюкозы в норме, 28,5% — на верхней границе нормы и у 28,5% пациентов концентрация глюкозы в сыворотке крови выше нормы. Также уровень СРБ превышает норму у 71,4% пациентов, что может говорить о наличии воспалительного процесса, тогда как у пациентов с ХК и ИМТ в пределах нормы эти показатели не превышены (табл. 3).

Оценка врожденного иммунитета

Определение функциональной биологической активности выявило сниженные показатели биологически активной продукции IFN I и II типов лейкоцитами крови у больных ХК (рис. 4).

Так, способность к продукции биологически активного IFN I и II типов лейкоцитами крови больных ХК составила: IFN α 140 [60; 160] ед/мл и IFN γ 12 [8; 16] ед/мл ($p < 0,05$) соответственно (рис. 4).

Как следует из полученных данных, при ХК развивается выраженный IFN-дефицит, особенно продукции биологически активного IFN γ лейкоцитами крови.

Следует отметить, что в сыворотке крови не выявлены белки IFN α , отсутствие которого в сыворотке может приводить к рецидивирующим инфекциям. Одним из важных направлений фор-

мирования полноценного иммунного ответа является регуляция синтеза интерферонов.

Обсуждение

Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма. Цитокины вовлечены фактически в каждое звено иммунитета; для них характерен сложный сетевой характер функционирования, при котором продукция одного из них влияет на образование или проявление активности ряда других.

Метаболический синдром представляет собой симптомокомплекс, объединяющий нарушения липидного и углеводного обмена и их патологические проявления, связанные с дисбалансом провоспалительных цитокинов, таких как TNF α и IL-6, представляет интерес роль IL-19 при МС в развитии кожных процессов (псориаза), миастении, поражении сосудов, с активацией путей поляризации Th2-лимфоцитов и M2-макрофагов [2]. Высокий ИМТ может являться одной из причин множественных патологий, таких как атеросклероз, сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет 2-го типа. Известно, что существует связь между ожирением и воспалением [6]. Жировые ткани играют решающую роль в этом контексте, потому что они являются основным источником цитокинов, хемокинов и метаболически активных медиаторов, называемых адипокинами. Было показано, что адипокины, включая адипонектин и лептин, регулируют

ТАБЛИЦА 2. ДАННЫЕ ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ С ХК И ИМТ ВЫШЕ НОРМЫ

TABLE 2. DATA OF THE GROUP OF PATIENTS WITH CU AND BMI ABOVE NORMAL

№ No.	ИМТ BMI	Глюкоза Glucose	СРБ CRP
1	31,1	6,9	0,2
2	27,51	4,7	6,2
3	31,6	5,5	7,5
4	29,59	6,9	8,1
5	29,86	4,4	7,8
6	30,6	5,6	5,9
7	31,6	5,0	1,0

ТАБЛИЦА 3. ДАННЫЕ ОАК ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ С ХК И ИМТ В НОРМЕ

TABLE 3. GBA DATA OF THE GROUP OF PATIENTS WITH CU AND BMI IS NORMAL

№ No.	ИМТ BMI	Глюкоза Glucose	СРБ CRP
1	24,28	4,6	2,1
2	18,47	5,1	1,8
3	23,39	4,4	2,1
4	18,09	5,1	1,1
5	19,6	4,4	2,1
6	15,7	5,2	1,2
7	18,29	5,0	0,8
8	19,0	4,9	1,9
9	18,4	4,5	0,8
10	21,6	5,3	0,0
11	24,61	4,8	1,7
12	22,84	5,4	1,5
13	20,45	4,8	0,7
14	24,03	5,0	1,9

Примечание. ОАК – общий анализ крови.

Note. GBA, general blood analysis.

воспалительные иммунные реакции в хряще [13]. Определена ведущая роль висцеральной жировой ткани в развитии инсулинорезистентности. Однако в настоящее время феномен инсулинорезистентности изучен недостаточно, не выявлены этиологические факторы развития патологического процесса, лечение крапивницы у пациентов с МС представляет особую трудность.

Выявлено, что у пациентов с ХК и повышенным ИМТ уровень всех исследованных Т-ре-

гуляторных цитокинов ниже по сравнению с группой пациентов с нормальным ИМТ, за исключением IL-10. Вероятно допустить, что это факт некоторой комбинаторики депрессии иммунного реагирования и влияния цитокинов жировой ткани.

В соответствии с литературными данными исследования Yuesheng Liu и соавт., в котором оценивали уровень IL-10 при детском ожирении с гипертриглицеридемией, концентрация сыво-

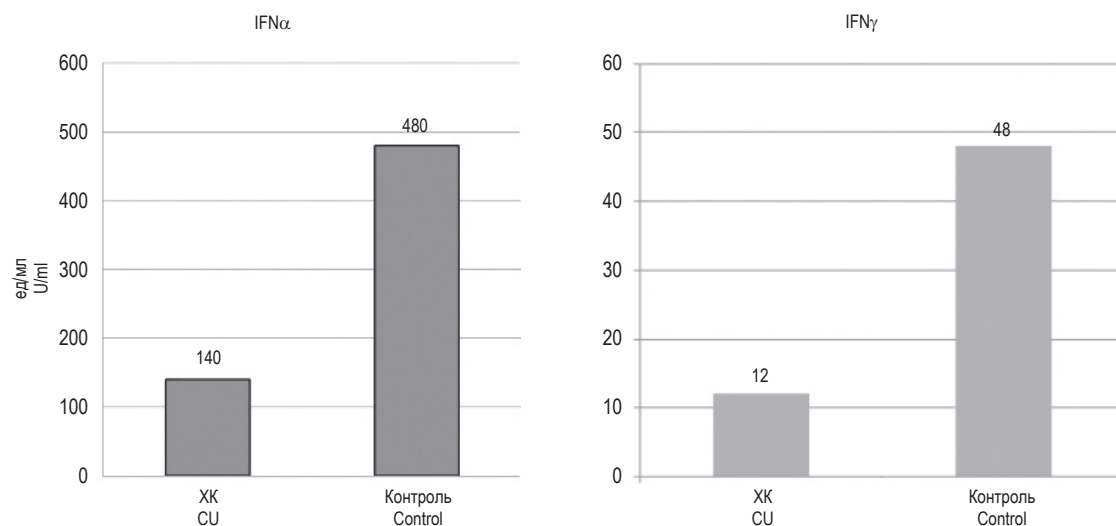


Рисунок 4. Биологическая активность IFNα и IFNγ при хронической крапивнице и в группе контроля

Figure 4. Biological activity of IFNα and IFNγ in chronic urticarial and in the control group

роточного IL-10 снижена у детей с ожирением и гипертриглицеридемией.

Распространенность детского ожирения и связанных с ожирением метаболических расстройств, таких как дислипидемия, резко возросла за последние несколько десятилетий. Хроническое воспаление слабой степени связано с развитием сопутствующих заболеваний и плохим прогнозом при ожирении [11].

Согласно другим данным эксперимента [7], в котором изучалась роль IL-10 в патогенезе ХСК путем проведения кожной аутологической пробы и теста на высвобождение гистамина у пациентов с ХСК и у здоровых людей. Мышей использовали в качестве разработки модели для ХСК. Авторы выявили избыточную экспрессию IL-10 и ингибирование пути JAK/STAT, а также комбинацию всех этих состояний у мышей с ХСК и контрольных мышей. Выявлены эозинофилы в тканях кожи, экспрессия воспалительных цитокинов и распределение подмножеств Т-лимфоцитов в периферической крови мышей. По сравнению с контрольной группой мыши с ХСК имели более длительную продолжительность и более высокую частоту зуда и продемонстрировали повышенные уровни CD8⁺, количество эозинофилов и экспрессия воспалительных цитокинов в сыворотке, а также активированный сигнальный путь JAK/STAT. Эта тенденция была обнаружена у мышей ХСК со сверхэкспрессией IL-10 по сравнению с мышами с ХСК без лечения. Напротив, ингибирование JAK/STAT полностью изменило вышеуказанную тенденцию. В целом это исследование показывает, что IL-10 способствуют развитию ХСК посредством активации сигнального пути JAK/STAT [10].

У пациентов в изучаемой группе с ХК нами получены повышенные значения IL-19 (66,7%) и IL-20 (62%). По современным данным, роль IL-19 связывают с инициацией эндотелиальной дисфункции у пациентов с атеросклерозом, язвенным колитом, псориазом [2]. IL-19 участвует в активации поляризации Th2-лимфоцитов и M2-макрофагов, активность этих клеток связана с продукцией цитокинов: IL-10, IL-5, IL-4. Под их влиянием происходит изменение липидного профиля, проницаемость эндотелия и, как вариант, формирование у части пациентов хронической крапивницы. Эти результаты согласуются с повышением IL-10 в исследуемой группе.

Показано, что при ХК развивается выраженный IFN-дефицит, особенно продукции биологически активного IFNγ лейкоцитами крови. Возможно, дефекты врожденного иммунитета являются одной из причин возникновения ХК. Известно, что длительная персистенция вирусов приводит к вторичному иммунодефициту, вместе с тем в свою очередь вторичный иммунодефицит способствует активации самих вирусов [3]. Так или иначе, в патогенезе заболевания иммунокомпетентность организма больного имеет большое значение. На фоне IFN-дефицита могут чаще возникать обострения ХК. Как выяснилось, в анамнезе пациентов с ХК имеется чаще всего персистирующая герпесвирусная инфекция, которая может приводить организм больного в состояние IFN-иммунодефицита. Вирусы семейства *Herpesviridae* способны влиять на нормальное функционирование регуляторных Treg-клеток, утяжеляя течение основного заболевания.

Регуляция синтеза интерферонов является одним из важных направлений формирования

полноценного иммунного ответа. Продукция $IFN\gamma$ Th1- и NK-клетками осуществляется благодаря стимуляции так называемыми $IFN\gamma$ -индуцирующими цитокинами, такими как IL-12, IL-2 и $TNF\alpha$. Повышенные уровни интерферонов лямбда предполагают связь ХК с хроническим воспалительным процессом. Отмечено, что белки Treg цитокинов выявлены в сыворотке крови пациентов с ХК в 19-85% случаев.

Заключение

1. В подгруппе пациентов с хронической крапивницей и ожирением уровень общего билирубина и активность АСТ в сыворотке крови статистически значимо выше ($p = 0,026$ и $p = 0,024$) соответственно, в сравнении с контрольной группой.

2. В подгруппах пациентов с хронической крапивницей и ожирением и пациентов с хронической крапивницей и нормальной массой тела уровень витамина D в сыворотке крови статистически значимо ниже ($p = 0,003$ и $p = 0,003$) соответственно, в сравнении с контрольной группой.

3. Обнаружена прямая зависимость между уровнем общего билирубина и активностью АЛТ, а также обратная зависимость между уровнем общего билирубина и концентрацией IL-19 в под-

группе пациентов с хронической рецидивирующей крапивницей с коморбидным ожирением (ИМТ > 27). Обнаружена прямая зависимость между уровнем общего билирубина и концентрациями IL-12 p40, IL-20, IL-28B/ $IFN\lambda 2$, IL-35 в подгруппе пациентов с хронической крапивницей и нормальной массой тела.

4. Проведено исследование спектра выявления потенциальных биомаркеров: Т-регуляторных IL и IFN , как провоспалительных цитокинов, а также изучение биологической активности IFN лейкоцитами крови, как показателей врожденного иммунитета. Показан значительно сниженный потенциал врожденного иммунитета при ХК. Крайне важно выявить такие биомаркеры, по которым можно установить «эндотип» заболевания, классифицировать тяжесть развития болезни и эффективность применяемой терапии. Требуется большее количество клинических образцов для получения более информативной картины.

Изучение особенностей продукции Treg-цитокинов при хронической крапивнице дает возможность обнаружения биомаркеров, которые могли бы помочь клиницистам в постановке правильного диагноза, описания тяжести заболевания, прогноза ответа на определенную терапию.

Список литературы / References

1. Голубчикова Р.Н., Данилычева И.В., Реброва О.Ю. Ретроспективный анализ анамнестических и клинико-лабораторных данных больных хронической идиопатической крапивницей // Российский аллергологический журнал, 2011. № 4. С. 23-33. [Golubchikova R.N., Danilycheva I.V., Rebrova O.Yu. Retrospective analysis of anamnestic and clinical and laboratory data in patients with chronic idiopathic urticaria. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2011, no. 4, pp. 23-33. (In Russ.)]
2. Дутова С.В., Саранчина Ю.В., Килина О.Ю., Ханарин Н.В., Кулакова Т.С., Евельсон Ю.А. Интерлейкин 19: роль в атерогенезе и воспалительных процессах, перспективы использования (обзор литературы). Вестник новых медицинских технологий, 2019. Т. 26, № 3. С. 68-74. [Dutova S.V., Saranchina Yu.V., Kilina O.Yu., Khanarin N.V., Kulakova T.S., Evelson Yu.A. Interleukin 19: role in atherogenesis and inflammatory processes, prospects for use (literature review). *Vestnik novykh medicisnkih tekhnologij = Journal of New Medical Technologies*, 2019, Vol. 26, no. 3, pp. 68-74. (In Russ.)]
3. Ершов Ф.И., Оспельникова Т.П. Современный арсенал антигерпетических лекарственных средств // Инфекции и антимикробная терапия, 2001. Т. 3, № 4. С. 100-104. [Ershov F.I., Ospelnikova T.P. A modern arsenal of antiherpetic drugs. *Infektsii i antimikrobnaya terapiya = Infections and Antimicrobial Therapy*, 2001, Vol. 3, no. 4, pp. 100-104. (In Russ.)]
4. Оспельникова Т.П., Колодяжная Л.В., Табаков В.Ю., Ершов Ф.И. Способ определения продукции интерферонов как параметров врожденного иммунитета. Патент на изобретение РФ № 2657808 от 10.07.2017, опубликован: 15.06.2018. [Ospelnikova T.P., Kolodyazhnaya L.V., Tabakov V.Yu., Ershov F.I. Method for determining the production of interferons as parameters of innate immunity. Patent for invention of the Russian Federation No. 2657808 dated 07/10/2017, published: 06/15/2018].
5. Bracken S.J., Abraham S., MacLeod A.S. Autoimmune theories of chronic spontaneous urticaria. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 627. doi: 10.3389/fimmu.2019.00627.
6. Esser N., Legrand-Poels S., Piette J., Scheen A.J., Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2014, Vol. 105, no. 2, pp. 141-150.

7. Feng H., Feng J., Zhang Z., Xu Q., Hu M., Wu Y., Lu Y. Role of IL-9 and IL-10 in the pathogenesis of chronic spontaneous urticaria through the JAK/STAT signalling pathway. *Cell Biochem. Funct.*, 2020, Vol. 38, no. 4, pp. 480-489.
8. Folci M., Heffler E., Canonica G.W., Furlan R., Brunetta E. Cutting edge: biomarkers for chronic spontaneous urticaria. *J. Immunol. Res.*, Vol. 2018, 5615109. doi: 10.1155/2018/5615109.
9. Haynes B., Soderberg K.A., Fauci A.S. The immune system in health and disease. Harrison's principles of internal medicine. In: Jameson J., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L., Loscalzo J. eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. 19th ed. McGraw Hill Education, 2015.
10. Hillyer P., Mane V.P., Schramm L.M., Puig M., Verthelyi D., Chen A., Zhao Z., Navarro M.B., Kirschman K.D., Bykadi S., Jubin R.G., Rabin R.L. Expression profiles of human interferon-alpha and interferon-lambda subtypes are ligand- and cell-dependent. *Immunol. Cell Biol.*, 2012, Vol. 90, no. 8, pp. 774-783.
11. Liu Y., Xu D., Yin C., Wang S., Wang M., Xiao Y. IL-10/STAT3 is reduced in childhood obesity with hypertriglyceridemia and is related to triglyceride level in diet-induced obese rats. *BMC Endocr. Disord.*, 2018, Vol. 18, no. 1, 39. doi: 10.1186/s12902-018-0265-z.
12. Mathian A., Mouries-Martin S., Dorcham K., Devilliers H., Yssel H., Garrido Castillo L., Cohen-Aubart F., Haroche J., Hié M., Pineton de Chambrun M., Miyara M., Pha M., Rozenberg F., Gorochoff G., Amoura Z. Ultrasensitive serum interferon- α quantification during SLE remission identifies patients at risk for relapse. *Ann. Rheum. Dis.*, 2019, Vol. 78, no. 12, pp. 1669-1676.
13. Wang T., He C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2018, Vol. 44, pp. 38-50.

Авторы:

Оспельникова Т.П. — к.м.н., заведующая лабораторией интерферонов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Денисов А.А. — д.м.н., профессор кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Черевко Н.А. — д.м.н., профессор кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; директор МО «Центр Семейной Медицины», г. Томск, Россия

Кузьмина В.В. — младший научный сотрудник лаборатории интерферонов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Дмитрук В.С. — д.м.н., профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Нагайцева Д.С. — лаборант МО «Центр Семейной Медицины», г. Томск, Россия

Каргов И.С. — к.х.н., специалист по продукции — протеомика, Bio-Rad Laboratories, Москва, Россия

Authors:

Ospelnikova T.P., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Interferons, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Denisov A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Allergology and Immunology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Cherevko N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Allergology and Immunology, Siberian State Medical University; Director, Center of Family Medicine, Tomsk, Russian Federation

Kuzmina V.V., Junior Research Associate, Laboratory of Interferons, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Dmitruk V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Dermatovenereology and Cosmetology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Nagaitseva D.S., Laboratory Assistant, Center of Family Medicine, Tomsk, Russian Federation

Kargov I.S., PhD (Chemistry), Proteomics Product Production Specialist in Proteomics, Life Science Group, Moscow, Russian Federation

Поступила 05.04.2021

Отправлена на доработку 26.04.2021

Принята к печати 25.06.2021

Received 05.04.2021

Revision received 26.04.2021

Accepted 25.06.2021

ВАРИАТИВНОСТЬ СИМПТОМОКОМПЛЕКСА CATCH-22 В РАМКАХ СИНДРОМА ДЕЛЕЦИИ 22q11.2

Черемохин Д.А.^{1,2}, Дерябина С.С.^{1,2}, Тузанкина И.А.^{1,3}, Власова Е.В.³,
Никитина Н.В.², Болков М.А.¹

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

² ГАОУ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка», г. Екатеринбург, Россия

³ ГАОУ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Хромосомная патология — одна из самых частых причин возникновения врожденных пороков развития. Симптомокомплекс CATCH-22 чаще всего ассоциируется с микроделецией 22 хромосомы, при выявлении которой принято устанавливать диагноз синдром Ди Джорджи — известный первичный иммунодефицит или синдром врожденных ошибок иммунитета. По нашим данным по частоте встречаемости среди всех хромосомных аномалий синдром Ди Джорджи в Свердловской области на втором месте после синдрома Дауна, однако его диагностика не настолько проста в силу различной выраженности клинических проявлений, а также разнообразных форм дефектов 22 хромосомы. Кроме того, что существует несколько типичных вариантов микроделений 22q11, также встречаются и дупликации критически важных регионов, сопровождающиеся иммунодефицитом и другими симптомами CATCH-22. Эффективность диагностики хромосомных аномалий как в пре-, так и в постнатальном периоде во многом зависит от критериев формирования группы пациентов с подозрением на хромосомные аномалии и от примененных методов выявления наследственной патологии. В нашем исследовании мы провели анализ и сравнение результатов исследований 23 пациентов с различными перестройками региона 22q11.2, которые наблюдались у генетика и клинического иммунолога. В работе приведены данные о полиморфизме фенотипов при перестройках региона 22q11.2 с анализом патоморфологических проявлений в зависимости от типа структурной аномалии — del22q11.2 и dup22q11.2. Результаты анализа демонстрируют важность обладания спектром диагностических возможностей для лабораторного исследования микроделеционных и микродупликационных синдромов, ассоциированных с иммунозависимой патологией. Также было проведено сопоставление результатов молекулярно-генетической диагностики и фенотипических проявлений при делециях и дупликациях региона q11.2 хромосомы 22. Для выявления перестроек региона 22q11.2 были использованы два различных метода — Prenatal BoBs и мультиплексная лигазозависимая амплификация проб (MLPA). В частности, оба этих метода были использованы у одного и того же пациента для верификации диагноза, что позволило выявить отличия в их эффективности. Сделано заключение, что синдром делеции 22q11.2 обладает широкой гетерогенностью в фенотипических проявлениях: неврологические и иммунологические проявления, аномалии развития опорно-двигательного аппарата и внутренних органов, деформации черепа и лицевой дисморфизм. Каждый клинический

Адрес для переписки:

Черемохин Дмитрий Андреевич
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620041, Россия, г. Екатеринбург, ул. Флотская, 52.
Тел.: 8 (923) 417-04-68.
E-mail: dimacheremokhin@gmail.com

Address for correspondence:

Cheremokhin Dmitry A.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian
Academy of Sciences
620041, Russian Federation, Ekaterinburg, Flotskaya str., 52.
Phone: 7 (923) 417-04-68.
E-mail: dimacheremokhin@gmail.com

Образец цитирования:

Д.А. Черемохин, С.С. Дерябина, И.А. Тузанкина,
Е.В. Власова, Н.В. Никитина, М.А. Болков
«Вариативность симптомокомплекса CATCH-22
в рамках синдрома делеции 22q11.2» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1357-1366.
doi: 10.15789/1563-0625-VOC-2363
© Черемохин Д.А. и соавт., 2021

For citation:

D.A. Cheremokhin, S.S. Deryabina, I.A. Tuzankina,
E.V. Vlasova, N.V. Nikitina, M.A. Bolkov "Variability
of CATCH-22 symptom complex within the framework
of 22q11.2 deletion syndrome", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 6,
pp. 1357-1366. doi: 10.15789/1563-0625-VOC-2363
DOI: 10.15789/1563-0625-VOC-2363

случай является уникальным, требующим тщательного разбора клинических проявлений. Необходимо иметь широкий спектр диагностических возможностей для молекулярно-генетической верификации диагноза.

Ключевые слова: синдром делеции 22q11.2, синдром Ди Джорджи, MLPA, DGS, врожденные ошибки иммунитета, ВОИ, CATCH-22

VARIABILITY OF CATCH-22 SYMPTOME COMPLEX WITHIN THE FRAMEWORK OF 22q11.2 DELETION SYNDROME

Cheremokhin D.A.^{a, b}, Deryabina S.S.^{a, b}, Tuzankina I.A.^{a, c}, Vlasova E.V.^c, Nikitina N.V.^b, Bolkov M.A.^a

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

^b Medical Center "Healthcare of Mother and Child", Ekaterinburg, Russian Federation

^c Regional Children's Clinical Hospital, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Chromosomal pathology is one of the most common causes of congenital malformations. The CATCH-22 symptom complex is most often associated with a microdeletion of chromosome 22, upon detection of which it is customary to diagnose DiGeorge syndrome, a known primary immunodeficiency or syndrome of innate errors of immunity. According to our data on the frequency of occurrence among all chromosomal abnormalities, DiGeorge's syndrome takes second place in the Sverdlovsk region after Down's syndrome, but its diagnosis is not simple due to varying severity of clinical manifestations, as well as different forms of the chromosome 22 defects. Along with several typical variants of 22q11 microdeletions, there duplications of critical regions are also reported, accompanied by immunodeficiency and other symptoms of CATCH-22. The effectiveness of diagnosing chromosomal abnormalities both in pre- and postnatal period largely depends on the grouping criteria of the patients with suspected chromosomal abnormalities, and on the methods used to identify hereditary pathology. In our study, we analyzed and compared the results of studies of 23 patients with various rearrangements of the 22q11.2 region, which were observed by a geneticist and clinical immunologist. The paper presents data on the polymorphism of phenotypes associated with rearrangements of the 22q11.2 region with an analysis of pathomorphological manifestations depending on the type of structural anomaly, i.e., del22q11.2, or dup22q11.2. The results of analysis demonstrate importance of different diagnostic options for laboratory studies of microdeletion and microduplication syndromes associated with immune-dependent pathology. We also compared the results of molecular genetic diagnostics and phenotypic manifestations in deletions and duplications of the 22q11.2 region. To identify the rearrangements of 22q11.2 region, two different methods were used – Prenatal BoBs and multiplex ligase-dependent probes' amplification (MLPA). In particular, the both methods were used in the same patient to verify diagnosis, thus enabling to show differences in their efficiency. It was concluded that 22q11.2 deletion syndrome exhibits wide heterogeneity in phenotypic traits: neurological and immunological manifestations, anomalies in musculoskeletal development and internal organs, skull deformities and facial dysmorphism. Each clinical case was unique, requiring careful analysis of clinical manifestations. It is necessary to have a wide range of laboratory options for molecular genetic verification of the diagnosis.

Keywords: 22q11.2 deletion syndrome, DiGeorge syndrome, MLPA, DGS, innate error of immunity, IEI, CATCH-22

Введение

Микроделеции – это нуклеотидные «потери», размеры которых составляют, как правило, менее 2 млн пар оснований и находятся за гранью разрешающей возможности световой микроскопии [4]. Утрата строго определенных локусов

хромосом, содержащих до нескольких десятков функционально не связанных генов, приводит к формированию характерных симптомокомплексов, обозначаемых микроделеционными синдромами [7, 11]. Наиболее известными из этих генетических заболеваний являются синдромы Вильямса, Прадера–Вилли, Ангельмана, ми-

кроделеции 22q11.2 (фенотипы синдромов Ди Джорджи и вело-кардио-фациального, синдрома конотрункальных и лицевых аномалий), Вольфа–Хиршхорна, Смита–Магенис, Миллера–Дикера. Фенотипическая картина данных заболеваний детально описана и характеризуется широкой вариабельностью.

Синдром делеции 22q11.2 — нозологическая форма, характеризующаяся, хромосомной аномалией, возникающей в результате неаллельной рекомбинации в процессе мейоза во время сперматогенеза и/или овогенеза, при которой на длинном плече хромосомы 22 происходит делеция размеров от 1,5 до 3 мегабаз. На рисунке 1, опубликованном в статье Nogueira S.I. (2007), схематично изображен механизм формирования делеции — внутривитрихроматидное смещение направленных повторов (внутривитрихроматидная петля) с вырезанием, приводящим к делеции. Между гомологичными хромосомами происходит два межхромосомных обмена: одной проксимальной и одной дистальной области. Это приводит к делеции, включающей 4 критических региона А, В, С и D — блоков низкокопийных повторов. Результатом выпадения описываемых областей является нарушение эмбрионального развития третьей и четвертой жаберных дуг и, как следствие, нарушение развития их производных в эмбриональном периоде — тимуса и паращитовидных желез. В 85% случаев делеция возникает *de novo*, однако есть риск наследования данной патологии от родителей [1, 9].

Работы по изучению генного состава этих регионов позволяют сделать выводы о значимости кодирующих фрагментов, которые могут являться причиной развития той или иной фенотипической картины синдрома делеции у разных пациентов. Несмотря на то, что частоты вариативности длины делеции не столь высоки, важно сопоставлять генотип и фенотип, поскольку основной задачей современных диагностических служб является своевременная помощь в постановке диагноза и обеспечение обоснованной тактики лечения. Пренатальное выявление делеции 22q11.2 позволяет разработать стратегию ведения пациента еще до его рождения.

Материалы и методы

При выполнении исследования было проанализировано 23 истории болезни пациентов с аномалиями критического региона хромосомы 22, из них 18 случаев с классической делецией 22q11.2 (А-Д), один случай делеции 22q11.2 (В), один случай частичной делеции 22q11.2 (А), два случая

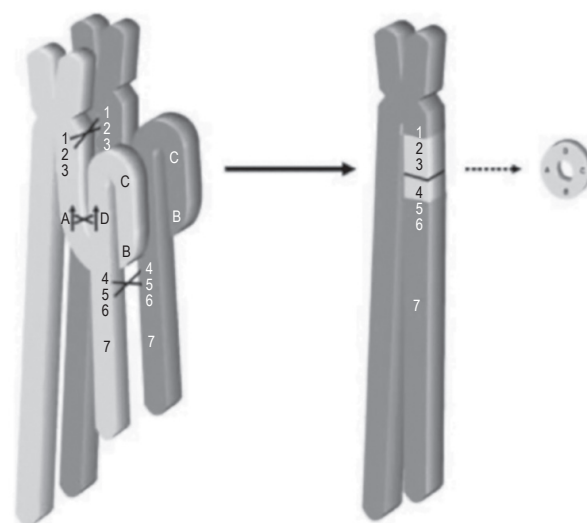


Рисунок 1. Схематическое изображение мейотической рекомбинации между гомологичными хромосомами 22 [9]

Примечание. Крестиками обозначены места перестановки. Номера с 1 по 7 представляют ДНК-маркеры F8VWFP2, D22S420, D22S427 (проксимальные области делеции), D22S303, D22S257, TOP1P2 (дистальные области делеции) и D22S302 (контроль в 22q13) соответственно. А, В, С и D представляют собой субрегионы А, В, С и D соответственно.

Figure 1. Schematic representation of meiotic recombination between homologous chromosomes 22 [9]

Note. Crosses indicate the places of permutation. Numbers 1 through 7 represent DNA markers F8VWFP2, D22S420, D22S427 (proximal deletion regions), D22S303, D22S257, TOP1P2 (distal deletion regions), and D22S302 (22q13 control), respectively. A, B, C, and D represent sub-regions A, B, C, and D, respectively.

с дупликацией региона 22q11.2 (А-Д) и один случай дупликации регионов 22q11.2 (А) + CES.

Молекулярное подтверждение делеции проводилось методами сравнительной геномной гибридизации, основанной на технологии BACs-on-Beads, с помощью набора Prenatal BoBs (PerkinElmer, Финляндия) и мультиплексной лигазозависимой амплификации (MLPA) с использованием наборов реагентов SALSA MLPA probemix P250-B2 (MRC Holland, Нидерланды).

Результаты и обсуждение

Говоря о классической делеции региона 22q11.2(А-Д), не стоит упускать из вида фенотипическую гетерогенность синдрома Ди Джорджи. Каждый клинический случай является особенным, проявляющимся разными морфологическими аномалиями. Лишь у 25% пациентов были обнаружены нарушения тимуса, хотя данный симптом значится одним из основных в характеристике симптомокомплекса CATCH-22 (Cardiac



Рисунок 2. Спектр врожденных пороков сердца у пациентов с делецией стандартного размера региона 22q11.2

Figure 2. Spectrum of congenital heart defects in patients with a standard size deletion of the 22q11.2 region

defects, Abnormal facies, Thymic hypoplasia, Cleft palate, Hypocalcemia, 22q11 deletion). Одним из наиболее распространенных проявлений синдрома делеции 22q11.2 является задержка психомоторного развития, которая была описана в 90% случаев.

Самым разнообразным в фенотипическом проявлении заболевания являются врожденные пороки сердца, которые описаны в 80% представленных случаев. Хотя они описаны практически у всех пациентов, поражает спектр сердечно-сосудистой патологии, который проявляется в аномалиях развития, начиная от магистральных сосудов и заканчивая наличием нефункциональных отверстий между камерами сердца (рис. 2).

Фенотипически такие дети уникальны, хотя и прослеживается тенденция общих черт лица, строения тела. Аномалии строения черепно-лицевых структур у пациентов с делецией 22q11.2 включают аномалии строения и расположения ушных раковин, аномалии строения носа, глаз, расщелины губы и неба, асимметрия лица и деформации черепа (рис. 3). Однако наличие только этих черепно-лицевых аномалий, в том числе вытянутого лица, не является патогномоничным и может варьировать, особенно с учетом расовой принадлежности пациентов [8]. Среди аномалий строения и расположения ушных раковин встречались: оттопыренность, низкопосаженность ушных раковин, асимметрия расположения и размера ушей, ротация ушных раковин кзади, микроtia, дисплазия ушных раковин, гипоплазия завитков, деформация слуховых косточек. Аномалии строения глаз: гипо-/гипертелоризм, сужение разреза глаз, укорочение и асимметрия

глазных щелей. Аномалии опорно-двигательного аппарата: гипермобильность суставов, асимметрия верхних и нижних конечностей, клинодактилия, шейный птеригиум, дополнительные фаланги, ассиметричный рост пальцев, вальгусная деформация стоп, плоскостопие.

Гипоплазия или аплазия тимуса у пациентов с синдромом делеции 22q11.2 вызывает иммунодефицит, который в первую очередь проявляется недостаточностью Т-клеточного звена иммунитета. В исследовании 60 пациентов с подтвержденной делецией 22q11.2 в возрасте старше 6 месяцев в 77% случаев отмечен и подтвержден иммунодефицит вне зависимости от наличия или отсутствия его клинических проявлений [6, 12]. Дополнительным частым признаком у больных с синдромом делеции 22q11.2 является аспирационная пневмония, связанная как с дисфагическими явлениями (частые поперхивания вследствие неправильного строения вело-фарингеальных структур), так и со снижением иммунологической защиты. Помимо типичных проявлений Т-клеточной недостаточности среди пациентов, входящих в анализируемую группу, встречались случаи снижения секреторного иммуноглобулина А, повышение концентрации IgM, эозинофилия, полинозы, atopический дерматит.

Особое место среди клинических проявлений синдрома делеции 22q11.2 занимает психоневрологическая симптоматика (рис. 4). Психомоторное развитие пациентов с данной патологией, как правило, задержано. У многих пациентов с делецией 22q11.2 наблюдают гипотонию в неонатальном периоде, средний возраст начала хождения составляет 18 месяцев. В 44% отмечалась задерж-

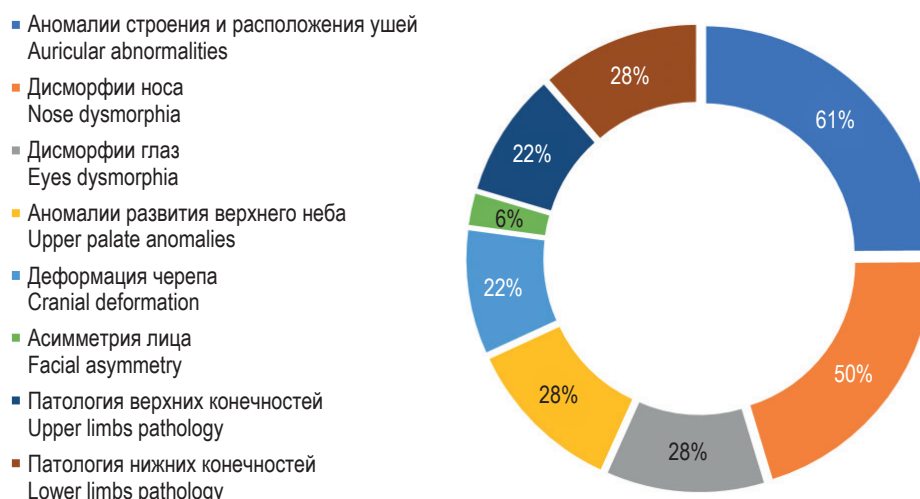


Рисунок 3. Спектр микроаномалий развития у пациентов с делецией стандартного размера региона 22q11.2

Figure 3. Spectrum of developmental microanomalies in patients with a standard size deletion of the 22q11.2 region

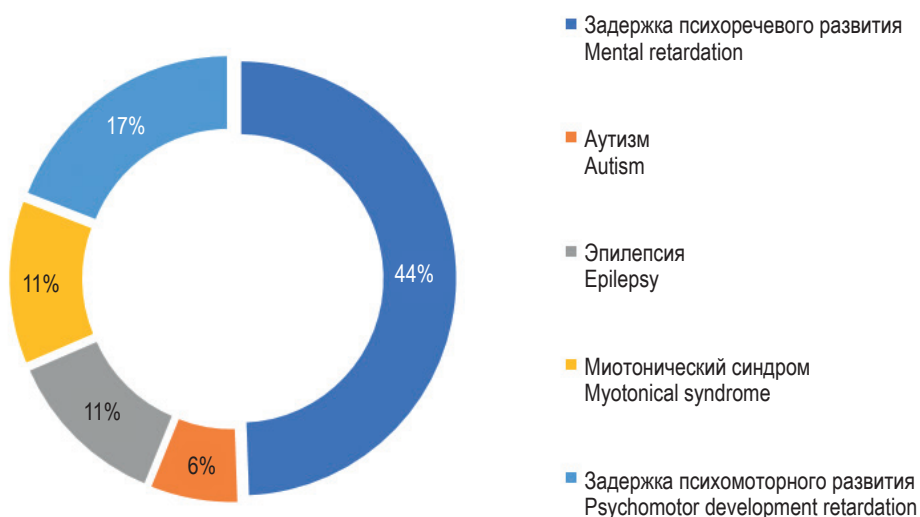


Рисунок 4. Спектр психоневрологических проявлений у пациентов с делецией стандартного размера региона 22q11.2

Figure 4. Spectrum of neuropsychiatric manifestations in patients with a standard size deletion of the 22q11.2 region

ка речевого развития, аутистические нарушения были отмечены только у 1 пациента анализируемой выборки, однако специфические нарушения со стороны центральной нервной системы не характерны [5].

Поведение пациентов с синдромом делеции 22q11.2 включает расторможенность и импульсивность с одной стороны и застенчивость, замкнутость — с другой. Наблюдается дефицит внимания, тревожность, сложности социализации [10]. Частота психиатрических расстройств, включая шизофрению, биполярные расстрой-

ства, депрессию, у таких пациентов повышена [2, 3].

Уникальными клиническими примерами являются случаи дупликации региона 22q11.2. В литературе описано множество противоречивых мнений о данной хромосомной патологии. Одни авторы утверждают, что она является значимой в патогенезе заболевания, другие опровергают это [13, 14].

Наше исследование не является исключением. В одном из случаев описаны яркие клинические симптомы наследственной патологии: выражен-

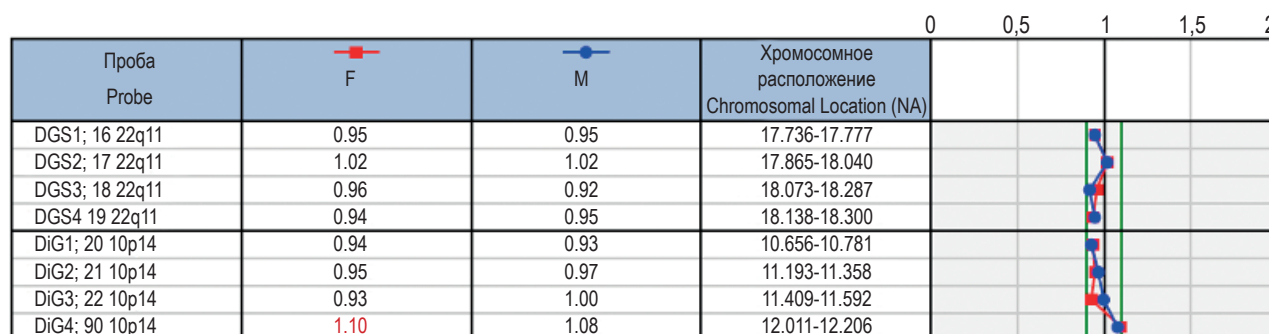


Рисунок 5. Результат анализа доз генов методом BoBs для пациента А. – делеций, ассоциированных с клиническими фенотипами синдрома Ди Джорджи не выявлено

Figure 5. Result of gene dose analysis by BoBs method for patient A. – no deletions associated with clinical phenotypes of DiGeorge syndrome were found

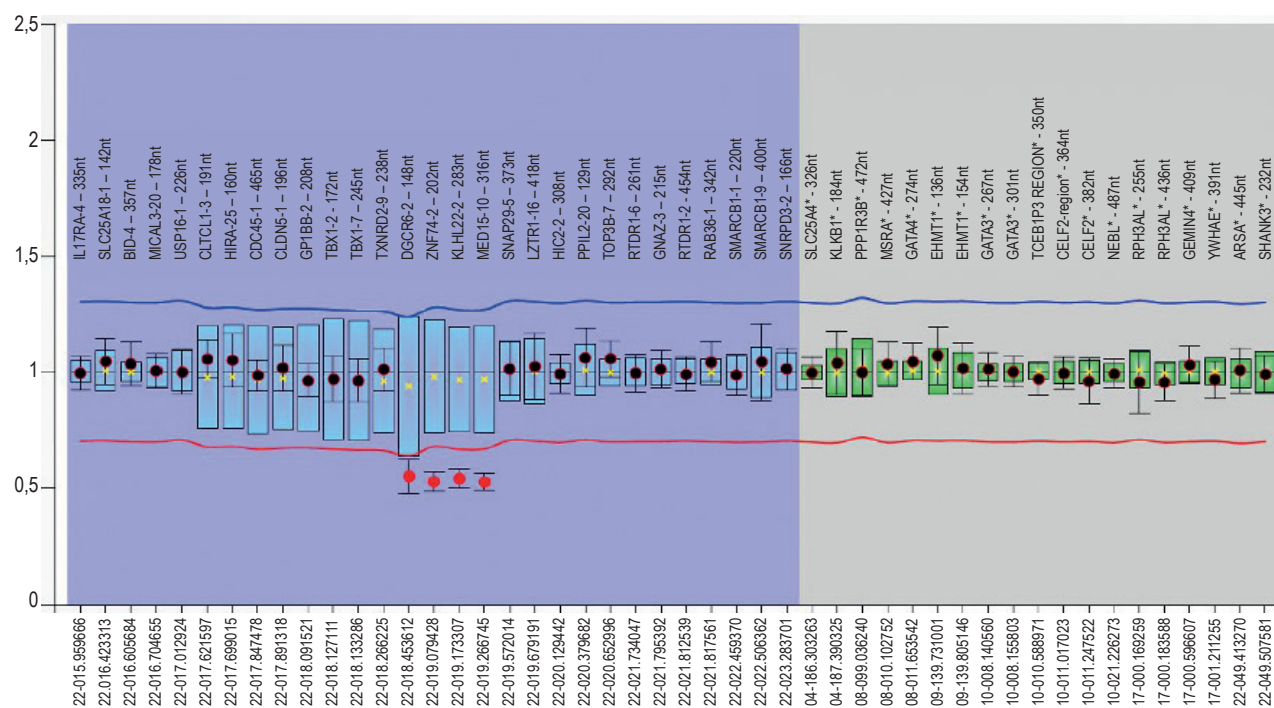


Рисунок 6. Результат анализа доз генов методом MLPA для пациента А. – делеция субрегиона В

Figure 6. Result of gene dose analysis by MLPA method for patient A. – deletion of subregion B

ная дизартрия, велофарингеальная недостаточность, микротия наружного слухового прохода, деформация слуховых косточек. Хотя со стороны тимуса определенных нарушений обнаружено не было, в анамнезе имеются данные за частые рекуррентные вирусные инфекции респираторного тракта и полиноз, что свидетельствует об иммунозависимой составляющей данного синдрома. В другом случае синдрома дупликации ни фено-

типических, ни клинических проявлений описано не было.

Интересными являются случаи делеции нестандартных размеров. В наше поле зрения попали редкие случаи делеции 22q11.2 (В) и частичной делеции 22q11.2 (А).

Клинический случай № 1

Пациент А. – мальчик доношенный от 5-й беременности, 3-х родов (1-я – брат, несовершенный остеогенез в анамнезе; 2-я – медикаментоз-

ный аборт (м/а); 3-я — брат, здоров; 4-я — м/а;), беременность протекала с хронической гипоксией плода и перинатальным поражением центральной нервной системы. Вес при рождении 3360 г, длина тела — 52 см. Направлен в медико-генетический центр по поводу микроаномалий развития (проксимальная синдактилия 2-3 пальцев правой стопы) и задержки психоречевого развития. Кроме того, были выявлены расстройства аутистического спектра, симптоматическая эпилепсия, миотонический синдром и нарушение сна, при сборе анамнеза был заподозрен синдром Ди Джорджи. Для уточнения клинического диагноза было проведено исследование методом ВАСs-on-Beads (BoBs) с целью поиска частого микроделеционного синдрома, однако желаемого результата обнаружить не удалось (рис. 5), поэтому проведено молекулярно-генетическое исследование с более высокой разрешающей способностью — с большим покрытием региона 22q11.2, в частности методом мультиплексной лигазозависимой амплификации (MLPA).

В результате исследования обнаружена делеция региона 22q11.2 нестандартного размера, включающая субрегион В (рис. 6), который не покрывается зондами при использовании метода BoBs.

Интересным является тот факт, что при такой неклассической делеции региона 22q11.2 не наблюдалось таких наиболее частых проявлений данной патологии, как врожденные пороки сердца, гипо- или аплазия тимуса и парашитовидных желез и лицевой дизморфизм. Вероятно, это объясняется тем, что в данный субрегион не входят гены, считающиеся основными триггерами при формировании фенотипа CATCH-22 — *TBX1* и *HIRA*.

Данный клинический случай отражает важность обладания возможностью использовать различные подходы к молекулярно-генетической диагностике. Использование дополнительных подтверждающих и уточняющих методов позволит расширить диагностические возможности лаборатории и сузить количество молекулярно неподтвержденных нозологий.

Клинический случай № 2

Пациент Б. — девочка, доношенная, от 1-й беременности, осложненной кольпитом и пиелонефритом. В перинатальный период констатирован синдром задержки внутриутробного развития плода 3-й степени по гипопластическому типу. Родилась в сроке в 38 недель гестации с массой тела 1770 г, длина тела 44 см, длина окружности головы 32 см. При детальном осмотре профиль-

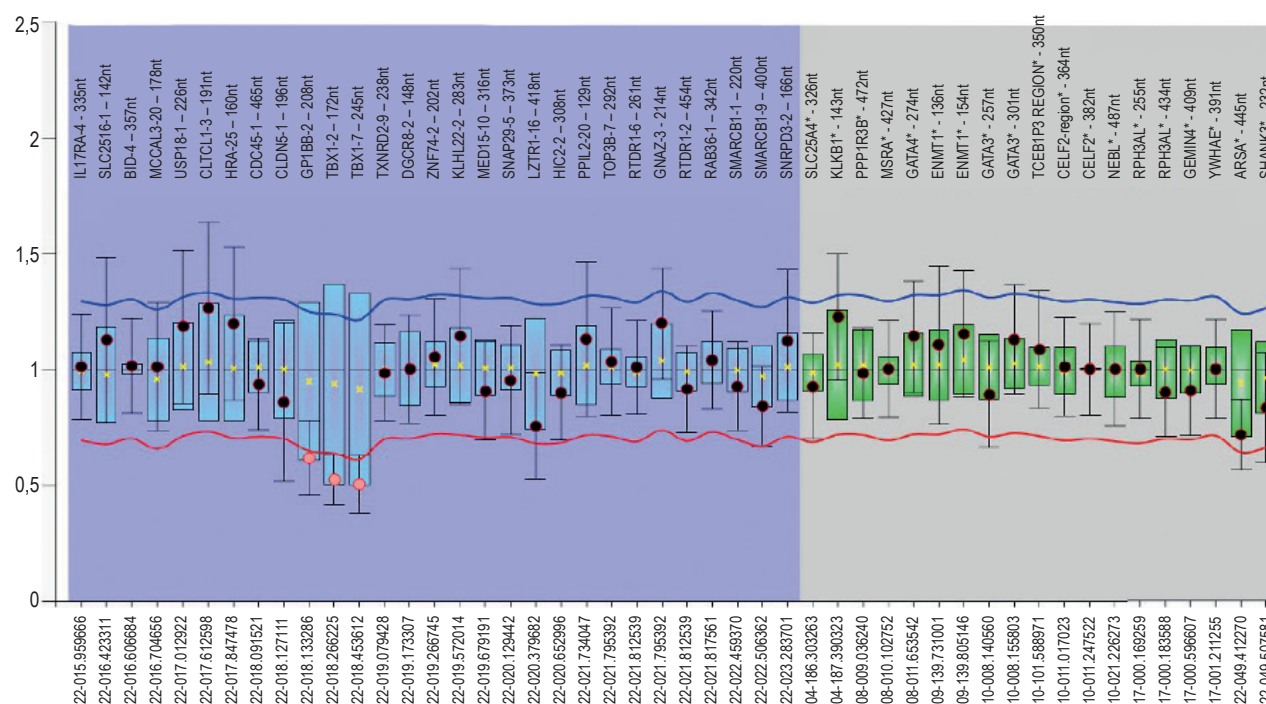


Рисунок 7. Результат анализа доз генов методом MLPA для пациента В. — выявлена частичная делеция субрегиона А

Figure 7. Result of gene dose analysis by MLPA method for patient B. — partial deletion of subregion A was revealed

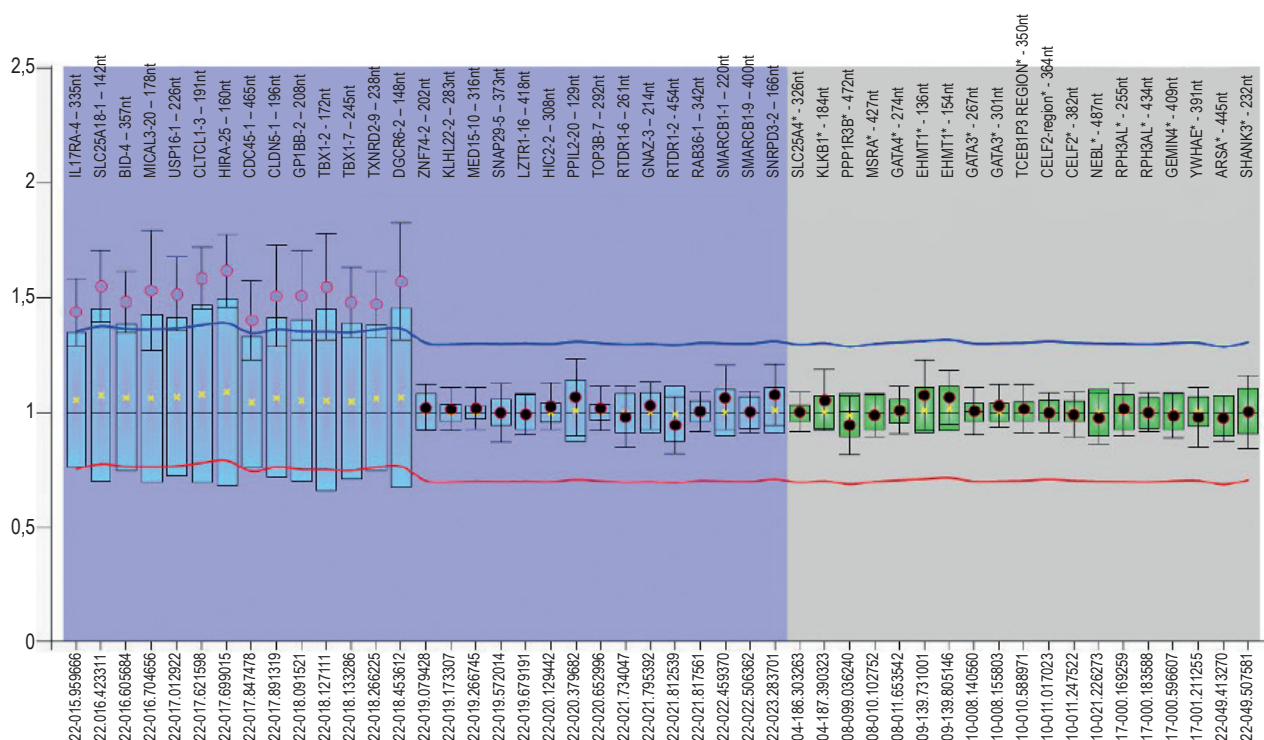


Рисунок 8. Результат анализа доз генов методом MLPA для пациента С. – выявлена дупликация региона 22q11.2 (A-D) и региона ответственного за развитие синдрома «кошачьего глаза»

Figure 8. Result of the analysis of gene doses by the MLPA method for patient C. – duplication of the 22q11.2 (A-D) region and the region responsible for the development of the cat's eye syndrome was revealed

ными специалистами был обнаружен ряд неврологических проблем: тетравентрикулярная обструктивная гидроцефалия, дистрофически-атрофическая энцефалопатия, спастический тетрапарез, бульбарный синдром, выраженная задержка психо-речевого развития, атрофия зрительных нервов, горизонтальный нистагм. Помимо неврологической патологии, клиническая картина осложнена врожденными пороками сердца (дефект межжелудочковой патологии, открытый аортальный проток), пороком мочевой системы (уретерогидронефроз), другими аномалиями развития (добавочный трахеальный бронх, дисплазия ушных раковин), пороком развития иммунной системы в виде гипоплазии тимуса. Все вышесказанное сформировало единый патологический синдром, классифицируемый как один из синдромов врожденных ошибок иммунитета (в предшествующих классификациях «первичный иммунодефицит»), в клинических проявлениях которого, кроме множественных пороков развития, отмечалось тяжелое течение инфекций, в том числе оппортунистических и нарушения репарации. Клинические проявления иммунодефицита в данном случае – интерстициальная пневмония и генерализованная оппорту-

нистическая бактериальная инфекция (*Serratia marcescens* и *Enterococcus faecalis*).

Исходя из данных, полученных при сборе анамнеза заболевания, был заподозрен синдром Ди Джорджи, что требовало молекулярно-генетической верификации. Для подтверждения диагноза было проведено исследование методом MLPA, где была обнаружена микроделеция части субрегиона А локуса 22q11.2 (рис. 7). В отличие от предыдущего клинического примера, данная делеция захватывает ген *TBX1*, что, вероятно, привело к такой яркой синдромальной картине.

Клинический случай № 3

Пациент В. – девочка от 5-й беременности 2-х родов (1-я – м/а; 2-я – сын, здоров; 3-я, 4-я – м/а). Родилась преждевременно – на 36-й неделе гестации с весом 2530 г, длина тела – 50 см, длина окружности головы – 31 см. Беременность протекала на фоне хламидиоза, трихомониаза и хронической фетоплацентарной недостаточности. В перинатальный период поставлен диагноз «синдром задержки развития плода 2-3-й степени». При обследовании в медико-генетическом центре фенотипически были отмечены следующие аномалии развития: плоский симметрично скошенный затылок, деформация лобной кости –

западение в латеральных областях, поперечная борозда левой ладони, срединная расщелина неба, врожденные пороки сердца (дефект межпредсердной перегородки и стеноз клапана легочной артерии), дефицит массы тела и глубокая задержка психомоторного развития. Относительно клинической картины был заподозрен синдром микрохромосомной аномалии, и материал пациента был отправлен в лабораторию для молекулярно-генетической верификации диагноза. В результате проведения мультиплексной лигазо-зависимой амплификации проб с последующим анализом доз генов, входящих в набор SALSA MLPA probemix P250-B2 (MRC Holland), была обнаружена дупликация региона 22q11.2, захватывающая стандартную область делеции 22q11 (A-D) при синдроме Ди Джорджи и область, при

делеции которой формируется клиническая картина синдрома «кошачьего глаза» (рис. 8).

Заключение

Таким образом, представленные результаты наших исследований свидетельствуют о том, что синдромы делеции/дупликации региона 22q11.2 могут скрываться за различными «масками» врожденных аномалий, психоневрологических нарушений и другой патологией. Знание спектра фенотипических проявлений данных нозологических форм и узнавание ключевых знаков в каждом клиническом случае позволит использовать оптимальный метод лабораторного подтверждения диагноза и сориентировать врача в выборе патогенетически обоснованной стратегии лечения пациентов.

Список литературы / References

1. Тузанкина И.А., Дерябина С.С., Власова Е.В., Болков М.А. Семейный случай синдрома Ди Джорджи (синдрома делеции 22q11.2) // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 95-100. [Tuzankina I.A., Deryabina S.S., Vlasova E.V., Bolkov M.A. Familial case of chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 95-100. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-95-100.
2. Boot E., Mentzel T.Q., Palmer L.D., van Harten P.N., Marras C., Lang A.E., Bassett A.S. Age-related parkinsonian signs in microdeletion 22q11.2. *Mov. Disord.*, 2020, Vol. 35, no. 7, pp. 1239-1245.
3. Forsyth J.K., Nachun D., Gandal M.J., Geschwind D.H., Anderson A.E., Coppola G., Bearden C.E. Synaptic and gene regulatory mechanisms in schizophrenia, autism, and 22q11.2 copy number variant-mediated risk for neuropsychiatric disorders. *Biol. Psychiatry*, 2020, Vol. 87, no. 2, pp. 150-163.
4. Gu W., Zhang F., Lupski J.R. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*, 2008, Vol. 1, no. 1, 4. doi: 10.1186/1755-8417-1-4.
5. Hopkins S.E., Chadehumbe M., Blaine Crowley T., Zackai E.H., Bilaniuk L.T., McDonald-McGinn D.M. Neurologic challenges in 22q11.2 deletion syndrome. *Am. J. Med. Genet. A*, 2018, Vol. 176, no. 10, pp. 2140-2145.
6. Kuo C.Y., Signer R., Saitta S.C. Immune and genetic features of the chromosome 22q11.2 Deletion (DiGeorge Syndrome). *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2018, Vol. 18, no. 12, 75. doi:10.1007/s11882-018-0823-5.
7. Lupski J.R. Genomic disorders ten years on. *Genome Med.*, 2009, Vol. 1, no. 4, 42. doi: 10.1186/gm42.
8. McDonald-McGinn D.M., Sullivan K.E., Marino B., Philip N., Swillen A., Vorstman J.A., Zackai E.H., Emanuel B.S., Vermeesch J.R., Morrow B.E., Scambler P.J., Bassett A.S. 22q11.2 Deletion Syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2015, Vol. 1, 15071. doi: 10.1038/nrdp.2015.71.
9. Nogueira S.I., Hacker A.M., Bellucco F.T.S., Kulikowski L.D., Christofolini D.M., Cernach M.C., Emanuel B.S. Deletion 22q11.2: Report of a complex meiotic mechanism of origin. *Am. J. Med. Genet. A*, 2007, Vol. 143A, no. 15, pp. 1778-1781.
10. Schneider M., Debbané M., Bassett A.S., Chow E.W., Fung W.L., van den Bree M., Owen M., Murphy K.C., Niarchou M., Kates W.R., Antshel K.M., Fremont W., McDonald-McGinn D.M., Gur R.E., Zackai E.H., Vorstman J., Duijff S.N., Klaassen P.W., Swillen A., Gothelf D., Green T., Weizman A., Van Amelsvoort T., Evers L., Boot E., Shashi V., Hooper S.R., Bearden C.E., Jalbrzikowski M., Armando M., Vicari S., Murphy D.G., Ousley O., Campbell L.E., Simon T.J., Eliez S. Psychiatric disorders from childhood to adulthood in 22q11.2 deletion syndrome:

results from the International Consortium on Brain and Behavior in 22q11.2 Deletion Syndrome. *Am. J. Psychiatry*, 2014, Vol. 171, no. 6, pp. 627-639.

11. Shaw C.J., Lupski J.R. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum. Mol. Genet.*, 2004, Vol. 13, Spec. no. 1, pp. R57-R64.

12. Sullivan K.E. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome and DiGeorge syndrome. *Immunol. Rev.*, 2019, Vol. 287, no. 1, pp. 186-201.

13. Vyas S., Constantino J.N., Baldridge D. 22q11.2 duplication: a review of neuropsychiatric correlates and a newly observed case of prototypic sociopathy. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.*, 2019, Vol. 5, no. 6, a004291. doi: 10.1101/mcs.a004291.

14. Yu A., Turbiville D., Xu F., Ray J.W., Britt A.D., Lupo P.J., Jain S.K., Shattuck K.E., Robinson S.S., Dong J. Genotypic and phenotypic variability of 22q11.2 microduplications: An institutional experience. *Am. J. Med. Genet. A.*, 2019, Vol. 179, no. 11, pp. 2178-2189.

Авторы:

Черемохин Д.А. — аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; врач клинической лабораторной диагностики ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»», г. Екатеринбург, Россия

Дерябина С.С. — к.б.н., заведующая лабораторией молекулярной диагностики ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»»; научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Тузанкина И.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; врач аллерголог-иммунолог научного отдела ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Власова Е.В. — к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, заведующая отделением клинической иммунологии ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Никитина Н.В. — к.м.н., врач-генетик, врач-педиатр отделения медико-генетического консультирования ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»», г. Екатеринбург, Россия

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

Authors:

Cheremokhin D.A., Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Doctor for Clinical Laboratory Diagnostics, Medical Center "Healthcare of Mother and Child", Ekaterinburg, Russian Federation

Deryabina S.S., PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Diagnostics, Medical Center "Healthcare of Mother and Child"; Research Associate, Laboratory of Immunology of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Tuzankina I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Immunology of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Allergist-Immunologist, Regional Children's Clinical Hospital, Ekaterinburg, Russian Federation

Vlasova E.V., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Head, Department of Clinical Immunology, Regional Children's Clinical Hospital, Ekaterinburg, Russian Federation

Nikitina N.V., PhD (Medicine), Geneticist, Pediatrician, Department of Medical Genetic Counseling, Medical Center "Healthcare of Mother and Child", Ekaterinburg, Russian Federation

Bolkov M.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 27.05.2021
Принята к печати 01.06.2021

Received 27.05.2021
Accepted 01.06.2021

ПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРЕПАРАТА НУКЛЕОТИДНОЙ ПРИРОДЫ «ДЕРИНАТ» НА ТЕЧЕНИЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Корнева Е.А.¹, Дмитриенко Е.В.¹, Миямура С.², Акимото Н.²,
Нода М.²

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

² Высшая школа фармацевтических наук, Университет Кюсю, Япония

Резюме. Черепно-мозговая травма является наиболее частой причиной смерти и инвалидности среди молодых людей, включая спортсменов и солдат, людей в возрасте до 45 лет в промышленно развитых странах, и представляет растущую проблему со здоровьем как в развивающихся странах, так и среди стареющих людей, лечение которых является серьезной проблемой современной медицины. Этот вид травм приводит ко многим видам расстройств и очень часто к инвалидности, что обуславливает необходимость разработки новых методов лечения травм головного мозга. В экспериментах на мышах изучали новый метод лечения травм головного мозга, в частности использовали натриевую соль дезоксирибонуклеиновой кислоты. Этот препарат известен как смесь пептидов с иммуномодулирующим действием, который широко используется для лечения воспалительных, аллергических и аутоаллергических процессов. Натриевая соль дезоксирибонуклеиновой кислоты (DNA) (Деринат), выделенная из икры русского осетра, является препаратом, эффективность применения которого показана при лечении различных заболеваний. В настоящей работе показаны нейропротекторные, антиоксидантные и противовоспалительные эффекты «Дерината» на модели черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у крыс. Внутривентрикулярная инъекция «Дерината» в течение 3 дней после ЧМТ снижает объем повреждения ткани мозга. Иммуногистохимический анализ позволил констатировать морфологические изменения клеток микроглии в коре головного мозга и гиппокампе через 7 дней после ЧМТ, которые значительно снижались при введении препарата, как и индуцированное ЧМТ накопление 8-оксогуанина (8-oxoG) — маркера окислительного повреждения. Для изучения клеточного механизма противовоспалительных эффектов использовали первичную культивированную мышечную микроглию с АТФ (50 мкм и 1 мм) в качестве вещества, высвобождающегося в месте повреждения, для имитации воспалительной реакции *in vitro*. Введение «Дерината» обуславливало повышение количества мРНК нейротрофического фактора глиальных клеток (GDNF) и фактора роста нервов (NGF) в присутствии АТФ, а уровень мРНК активатора тканевого плазминогена (tPA) снижался при

Адрес для переписки:

Корнева Елена Андреевна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-07-24.
E-mail: korneva_helen@mail.ru

Address for correspondence:

Korneva Elena A.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-07-24.
E-mail: korneva_helen@mail.ru

Образец цитирования:

Е.А. Корнева, Е.В. Дмитриенко, С. Миямура,
Н. Акимото, М. Нода «Протективные эффекты
препарата нуклеотидной природы «Деринат» на
течение и клеточные механизмы черепно-мозговой
травмы в эксперименте» // Медицинская иммунология,
2021. Т. 23, № 6. С. 1367-1382.
doi: 10.15789/1563-0625-PEO-2392
© Корнева Е.А. и соавт., 2021

For citation:

E.A. Korneva, E.V. Dmitrienko, S. Miyamura, N. Akimoto,
M. Noda "Protective effects of Derinat, a nucleotide-based
drug, on experimental traumatic brain injury, and its cellular
mechanisms", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1367-1382. doi:
10.15789/1563-0625-PEO-2392
DOI: 10.15789/1563-0625-PEO-2392

действии АТФ в сочетании с «Деринатом» или без него. Хотя экспрессия мРНК интерлейкина-6 (IL-6) не изменялась при действии АТФ, она возрастала при аппликации «Дерината». Те же показатели фактора-α некроза опухоли (TNFα) были значительно ингибированы. Комплекс полученных данных раскрывает механизмы иммуномодулирующего действия дезоксирибонуклеиновых кислот при ЧМТ.

Ключевые слова: ЧМТ, микроглия, 8-охоG, АТФ, GDNF, NGF, TNFα

PROTECTIVE EFFECTS OF DERINAT, A NUCLEOTIDE-BASED DRUG, ON EXPERIMENTAL TRAUMATIC BRAIN INJURY, AND ITS CELLULAR MECHANISMS

Korneva E.A.^a, Dmitrienko E.V.^a, Miyamura S.^b, Akimoto N.^b, Noda M.^b

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

^b Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Japan

Abstract. Traumatic brain injury is the most common cause of death and disability in young people including sport athletes and soldiers, people under 45 years of age in the industrialized countries, representing a growing health problem in developing countries, as well as in aging communities. Treatment of the latter is a serious challenge for modern medicine. This type of injury leads to many kinds of disorders and, quite often, to disability. These issues require development of new methods for brain trauma treatment. The new approach to brain trauma treatment was studied in murine experiments. In particular, sodium salt of deoxyribonucleic acid (DNA) was used. This preparation is a drug known as a mixture of peptides with immunomodulatory effect which is widely used for different kinds of therapy. Derinat, a sodium salt of DNA, isolated from the caviar of Russian sturgeon, is a proven immunomodulator for treatment of diseases associated with reactive oxygen species (ROS), including brain ischemia-reperfusion (IR) injury. Here we show that treatment with Derinat exerts neuroprotective, anti-oxidative, and anti-inflammatory effects in experimental model of traumatic brain injury (TBI) in rats. Intraperitoneal injection of Derinat several times over 3 days after TBI showed less pronounced damage of the injured brain area. Immunohistochemical study showed that the Derinat-induced morphological changes of microglia in cerebral cortex and hippocampus 7 days after TBI. TBI-induced accumulation of 8-oxoguanine (8-oxoG), the marker of oxidative damage, was significantly attenuated by Derinat administration, both on 7th and 14th day after TBI. To investigate cellular mechanism of anti-inflammatory effects, the primary cultures of murine microglia supplied with ATP (50 M and 1 mM), as a substance released at injured site, were used to mimic the *in vitro* inflammatory response. Derinate treatment caused an increase of glial levels of mRNAs encoding neurotrophic factor (GDNF) and nerve growth factor (NGF) in the presence of ATP, whereas tissue plasminogen activator (tPA) mRNA was inhibited by ATP with or without Derinat. Interleukin-6 (IL-6) mRNA expression was not affected by ATP but was increased by Derinat. Both mRNA and protein levels of ATP-induced TNFα production were significantly inhibited by Derinat. These results partially contribute to understanding mechanisms of immunomodulatory effects of DNA preparations in traumatic brain injury.

Keywords: traumatic brain injury, microglia, 8-oxoG, ATP, GDNF, NGF, TNFα

Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is a result of outside force causing mechanical disruption of brain tissue and delayed pathogenic events that collectively exacerbate the injury. Since TBI is the most common cause of death and disability in young people including sports athletes and soldiers [8, 26], people under 45 years of age in the industrialized countries and represents a growing

health problem also in the developing countries [77], or in the aging community [43], it is important to improve early care and functional outcome by use of effective drugs and treatment. Mechanical forces of TBI cause rapid tissue deformation, resulting in primary physical damage [61]. These deformations may directly affect blood vessels, axons, neurons and glial cells in focal, multifocal or diffuse pattern. These

changes initiate dynamic and evolving processes that result in inflammatory, neurochemical and metabolic alterations [9, 63, 84].

The use of animal models is essential for better understanding of the secondary injury processes and for the development of novel therapies. Rat models are the most commonly used pre-clinical models of traumatic brain injury [5, 22, 50, 74, 85]. Weight-drop model uses the gravitational forces of a free-falling weight to produce a largely focal or diffuse brain injury and mimics the real-life conditions of brain injury [61]. In early stage of TBI, for example 1 day after TBI, a global glial reaction has been reported [93]. Among an interplay between the innate immune system, danger-associated molecular patterns and loss of self-tolerance leading to adaptive autoimmunity [68], astrocytes and microglia, are considered as key players in initiating an inflammatory response after injury, because these cells are capable of secreting various cytokines, chemokines and growth factors, and following injury to the central nervous system (CNS) [40]. In adult rat brains after TBI, astrocytes positive for glial fibrillary acidic protein (GFAP) and complement C3 (marker of bad/disruptive astrocytic A1 phenotype) were significantly increased and microglial phenotype was changed from a ramified appearance with long, thin, highly branched processes to a swollen amoeboid shape [14] or rod-shape [87]. Therefore, detailed analyses of therapeutic drugs on glial cells are needed.

Derinat is isolated from the soft roes of *Acipenser gueldenstaedtii* (Russian sturgeon), the sodium salt of highly purified native double-stranded DNA (molecular weight; 270-500 kDa), being used in Russia and several other countries in clinic for different pathological conditions [23, 34, 51]. It has been shown that this drug after applying weight-drop model of rat's TBI can normalize splenocyte cytotoxicity and proliferative activity on the 14th day after TBI. Also Derinat prevents development of spatial memory breakdown on 7th day after TBI, normalizes reduced research activity and increased level of anxiety in rats on 7th and 14th days after TBI [20].

In the present study, to investigate on cellular level, we performed immunostaining of the brain and tried to analyze functional changes of microglia, an immune cell population of the central nervous system (CNS) to understand the cellular mechanism of neuroprotection induced by Derinat against TBI.

Materials and methods

The study was approved by the Animal Research Committee of Kyushu University and the Institute of Experimental Medicine, and carried out in

accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Animal model of traumatic brain injury and drug treatment

The experiments were conducted using male 12-16-week-old Wistar rats (RC "Kurchatov Institute" NLA"Rappolovo", St. Petersburg, Russia), kept in a conventional environment. Animals were fed standard diet (GOST R 50258-92, Russia), normal water ad libitum, and were housed in plastic cages. Traumatic brain injury (TBI) (weight-drop/contusion model) was applied according to previously used method [61]: Drop a weight (90-120 g) to the vertex of the head from 120 cm. After trauma, intraperitoneal injection of either saline (control) or natural nucleotide drug, Derinat, 10 mg/kg at 2, 26, 50, or 74 h.

2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining to define damaged brain tissue

After 1, 7, and 14 days after trauma animals were anesthetized by pentobarbital sodium (50 mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with saline. Fresh brain tissues with 1 mm were stained with TTC to visualize. The damaged areas were quantitated by an image-analysis system (ImageJ, Wayne Rasband, NIH) and calculated as percentage of the whole brain area.

Immunohistochemistry for neuroglia

On 7 and 14 days after trauma animals were anesthetized by pentobarbital sodium (50 mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate-buffered saline (PBS; 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4). Brains were extracted, postfixed in the same fixative and placed in 20% sucrose solution for 24 h at 4 °C. Frozen sections of cortex with 30 µm were made and frozen until use. Frozen sections of 30 µm were sliced by a HM 550 cryostat (Micro-edge Instruments Co., Tokyo, Japan) and incubated for 1 h at room temperature in 5% donkey serum (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA). Then, the sections were incubated with the following antibodies against: Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1, 1:2000, Wako, Osaka, Japan), GFAP (Glial fibrillary acidic protein, 1:800, Millipore), or MAP-2 (1:1000, SIGMA) antibody for 24 h at 4 °C. Subsequently, the cells were rinsed three times for 5 min with PBS and then incubated for 4 h at room temperature in the secondary antibody (IgG-conjugated Alexa Fluor 488 or 594, 1:1000, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). To stain the cell nuclei, cells were washed in PBS and treated DAPI for 1 h, then washed with PBS and coverslipped. Digital images were acquired and analyzed using Axioskop2 plus equipped with a CCD camera, AxioCam.

Immunohistochemistry of 8-oxoguanine

In order to analyze the damage of DNA in traumatic brain area, 8-oxoguanine (8-oxoG) was observed immunohistochemically. To detect 8-oxoG in nuclear DNA, section has to be subjected to pre-treatment with 2N HCl for 1 h at room temperature, which allows an efficient denaturation of nuclear chromatin but an extensive degradation of mitochondrial DNA [70]. Free-floating sections pre-treated were incubated in Block Ace, for 30 min at room temperature, and then were incubated with primary antibody (N45.1 mAb 1:100, Japan Institute for the Control of Aging, Japan), which preferentially recognizes 8-oxoG in DNA, in 10% Block Ace, at 4 °C overnight. Alexa Fluor-labeled second antibodies were obtained from Invitrogen (Tokyo, Japan). Digital images were acquired using Axioskop2 plus equipped with a CCD camera, AxioCam. All sections from each experimental animal and group to be compared were processed in parallel.

Microglial cell culture

Mouse microglial cells were isolated from the mixed cultures of cerebrocortical and spinal cord from newborn (1-3 days postnatal) C57BL/6 J mice (8-10 mice, mixture of male and female) (Kyudo, Tosu, Japan), as described previously [67]. In brief, tissue was trypsinized for 3 min and dissociated with a fire-polished pipette. Mixed glial cells were cultured for 9-12 days in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Nissui, Tokyo, Japan) supplemented with 10% Hyclone fetal bovine serum (FBS; Hyclone Laboratories, UT, USA), 2 mM L-glutamine, 0.2% Dglucose, 5 mg/ml insulin, 0.37% NaHCO₃, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin at 37 °C in a 10% CO₂, with medium changes every 3 days. Microglial cells were then separated from the underlying astrocytic layer by gently shaking the flask for 2 h at 37 °C in a shaker-incubator (125 rpm). After unattached cells were removed, microglial cells were isolated as strongly adhering cells. The purity of microglia was > 98%, which was evaluated by staining with Iba1, a marker for microglia/macrophage [36]. Images of Iba1-staining was acquired and analyzed using Axioskop2 plus equipped with a CCD camera, AxioCam.

SYBR green-based real-time quantitative RT-PCR

Cultured microglia cells were plated in 60 mm dishes (10⁶ cells/dish) and incubated with adenosine-5'-triphosphate (ATP) to activate microglia and induce inflammatory response. With or without pre-treatment of nucleotide nature drug (1.5, 15, and 150 µg) for 24 h, the cells were subjected to total RNA extraction according to the protocol of the manufacture and purified with QIAamp RNA Blood Mini (Qiagen, Valencia, CA, USA). The amount

of total RNA concentration was measured using Smart SpecTM 3000 (Bio Rad, Tokyo, Japan). Total RNA (175 ng) was converted to cDNA by reverse transcription, using random 9 mer (Takara, Otsu, Japan) and RNA PCR kit (Takara). The primers were as follows: GDNF primers (forward: 5'-AAA AAT CGG GGG TGC GTC TTA-3', reverse: 5'-TCAGATACATCCACACCGTTTGTAG-3'); tissue plasminogen activator (tPA) primers (forward: 5'-GTC AGA TTC CAG TCA GTG TG-3', reverse: 5'-GTT GCT CGT GAT GGT TTT G-3'); NGF primers (forward: 5'-GCA GAC CCG CAA CAT CAC TG-3', reverse: 5'-TCT CCA ACC CAC ACA CTG ACA-3'); IL-6 primers (forward: 5'-CGA GCC CAC CAG GAA CGA AAG TC-3', reverse: 5'-CTG GCT GGA AGT CTC TTG CGG AG-3'); TNFα primers (forward: 5'-TCC CAA CAA GGA GGA GAA GT -3', reverse: 5'-TGG TAT GAA GTG GCA AAT CG -3'); and GAPDH (forward: 5'-TCT ACC CAC GGC AAG TTC AAC-3', reverse: 5'-TCT CGC TCC TGG AAG ATG GT-3'). All primers were purchased from Sigma Aldrich Japan (Tokyo, Japan). PCR amplification was undertaken for Thunderbird Sybr qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan) in Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan). Each reaction volume consisted of 12.5 µl Thunderbird Sybr qPCR Mix, 0.05 µl 50 × ROX reference dye, 1 µl mix of forward and reverse primers (0.3 µM each), and 11.45 µl RNAase free water containing cDNA (17.5 ng). PCR was done by 15 sec denaturation at 95 °C, and annealing/extending at 60 °C for 40 cycles. Each mRNA expression level was normalized by GAPDH. The mRNA expression was calculated relative to GAPDH using the $\Delta\Delta C_T$ algorithm.

Assay of TNFα

Cultured microglial cells were seeded in a 96-well plate at a density of 1.5×10^5 cells per well and were cultured for 1 day, according to our previous work [7, 28]. The cells were treated with 50 µM or 1 mM adenosine triphosphate (ATP) with or without Derinat (150 µg, 1.5 µg) for 12 h. After treatment of ATP, the amount of mouse TNFα released into the culture medium was measured by an ELISA kit (Biosource) with a detection limit of 3 pg/mL. The absorbency at 450 nm was performed by a Microplate Reader (model 450; Bio-Rad).

Statistical analysis

All data are presented as mean ± SEM. The statistical analyses of the results were evaluated by using two-tailed Student's unpaired t-test, one-way ANOVA followed by Dunnett's test or two-way ANOVA. P < 0.05 was considered statistically significant.

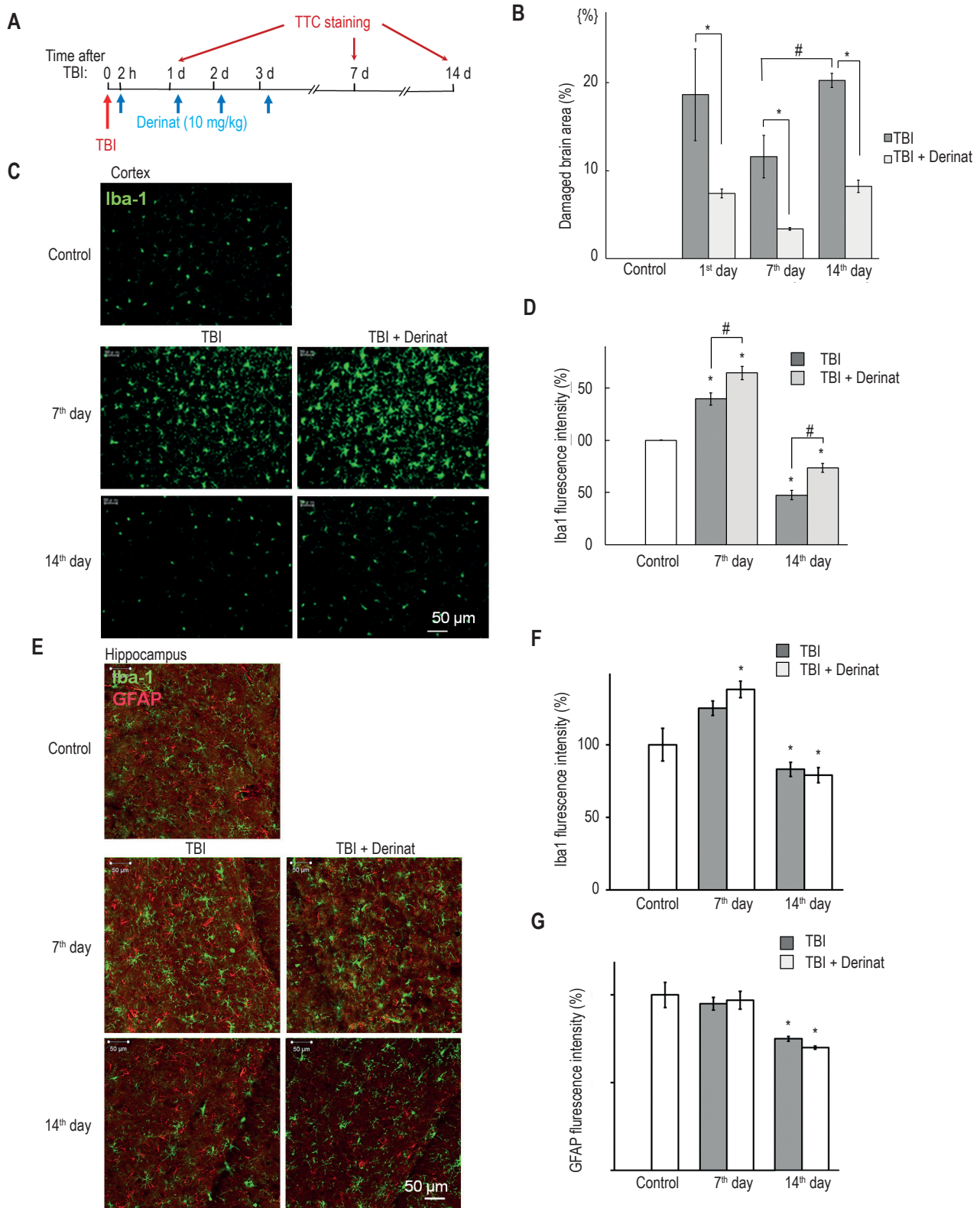


Figure 1. Derinat ameliorates traumatic brain injury (TBI) and activate microglia but not astrocytes

Note. (A) Experimental procedure. (B) Relative volumes of the injured area were calculated in the brain slices at 1st, 7th, and 14th day. (C) Representative images of Iba-1 immunostaining in cortex without TBI (control), 7 days and 14 days after TBI with or without Derinat. (D) Relative fluorescence intensity of Iba1 at day 7th and 14th day after TBI with or without Derinat. *, $p < 0.05$ compared to control. #, $p < 0.05$ compared between with and without Derinat. (E) Representative images of Iba1 (green) and GFAP (red) immunostaining in hippocampus without TBI (control), 7 days and 14 days after TBI with or without Derinat. (F) Fluorescent intensity of Iba1 in hippocampus of rat brain after TBI with and without Derinat. (G) Fluorescent intensity of GFAP in hippocampus of rat brain after TBI with and without Derinat. * $p < 0.05$ compared to control.

Results

Derinat ameliorated the traumatic brain injury (TBI) in rat model

After the TBI, Derinat (10 mg/kg) was intraperitoneal injected at 2, 26, 50, or 74 h. At day 1, 7, and 14, the fresh brains were subjected for TTC staining to measure tissue viability and evaluate infarct size [6, 49] (Figure 1A). Following TBI, TTC staining showed damaged brain area tissue with pale colour. The ratio of damaged brain area at day 1, 7, and 14 after TBI were significantly reduced by Derinat compare to those without Derinat (saline-injected) (Figure 1B). The damaged brain area at day 14 became significantly larger than that at day 7 (Figure 1B).

Derinat induced more activation of microglia but not astrocytes in the TBI area

At the injured brain area, activation of microglia, brain's immune cell population, was expected. Therefore, microglia/invading macrophage were stained by anti-Iba1 antibody followed by green fluorescence-conjugated secondary antibody. After TBI, increased number of Iba1-positive cells with

bigger cell bodies was observed (Figure 1C). The fluorescence intensity of Iba1 staining in cortex significantly increased on the day 7, however, on the day 14 it significantly decreased compare to control brains (Figure 1D). With Derinat treatment, the fluorescence intensity of Iba1 even increased, both at day 7 and 14 after TBI, suggesting that Derinat-induced microglial activation contributed to resist TBI.

As for the staining of astrocyte before and after TBI, anti-GFAP staining showed few cells in cortex and did not show much difference with or without Derinat (not shown). On the other hand, in the hippocampus, double immunostaining of Iba1 and GFAP showed substantial number of GFAP-positive cells (Figure 1E). At day 7 after TBI, more microglial cells with more ramified morphology and larger GFAP-positive cell bodies were observed (Figure 1E). Similar to cortex, increased fluorescent intensity of Iba1, especially with Derinat, was observed at day 7 and decreased Iba1-fluorescence at day 14 after TBI (Figure 1F), though there was no significant effect

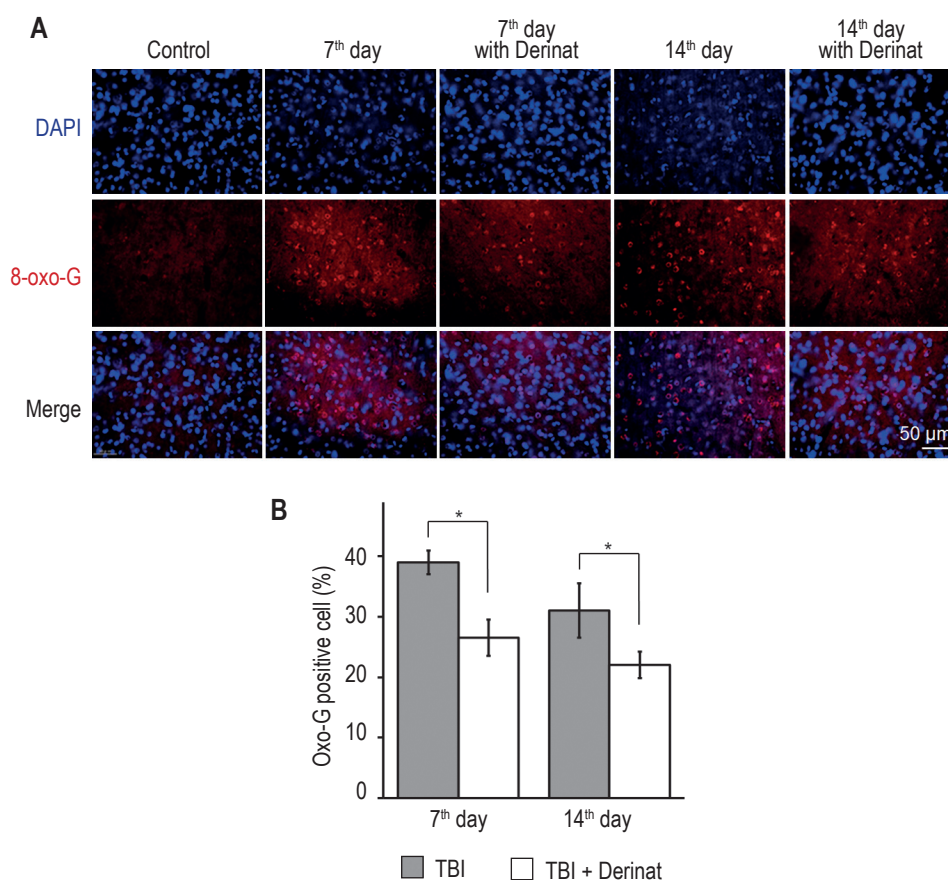


Figure 2. Effect of Derinat on nuclear DNA damage in the cortex of rat brain with TBI

Note. (A) Representative images of DAPI (blue) and 8-oxoG (red) immunostaining without TBI (control), at 7th and 14th day after TBI with and without Derinat. (B) Relative number of 8-oxoG-positive cells in the cortex of rat brain at 7th and 14th day after TBI with and without Derinat.

*p < 0.05 compared to without Derinat.

of Derinat. On the other hand, no significant change in GFAP-fluorescence intensity was observed at day 7 and decreased GFAP-fluorescence at day 14 after TBI, without any effect of Derinat (Figure 1G).

Nuclear DNA damage was inhibited by Derinat

To investigate the oxidative damage, accumulation of 8-oxoG after TBI was immunohistochemically detected (Figure 2). 8-oxoG is the major form of guanine oxidized by hydroxyl radical, and is accumulated in both mitochondrial and nuclear DNA [72]. Hence, 8-oxoG is widely used as an index of DNA oxidative stress. Double-staining of 8-oxoG and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was performed to identify the nuclear DNA damage (Figure 2A). Accumulation of nuclear 8-oxoG at day 7 and 14 after TBI was attenuated by Derinat treatment compare to untreated animal's brains (Figure 2B).

Effects of Derinat on the ATP-induced morphological and functional changes of microglia *in vitro*

Since morphological activation of microglia by Derinat was observed in the TBI area *in vivo*, functional changes of microglia were analyzed using primary cultured mouse microglia *in vitro*. To mimic the activation of microglia induced by traumatic injury, adenosine trisphosphate (ATP) was used, one of the substances released from damaged neurons and a typical activator of microglia. Two concentrations were used; 50 μ M to activate most of the purinergic receptors except P2X7 and 1 mM to activate microglial P2X7 receptor [32, 41].

With both 50 μ M and 1 mM ATP, microglial cells showed morphological activation; larger cell bodies with more membrane ruffling (Figure 3A). Treatment of microglial cells with only Derinat, microglial cells looked to be activated in a dose-dependent manner (Figure 3B). With pre-treatment of Derinat (application of Derinat prior to ATP treatment) at the concentration of 1.5, 15, and 150 μ M, it looked like more microglial activation with higher concentration in both ATP and Derinat (Figure 3B). With post-treatment of Derinat (application of Derinat after ATP), it looked like even more activation of microglia and rather fewer microglial cells with highest concentration of ATP and Derinat, suggesting a toxic effect of high concentration of the drugs (Figure 3C).

To investigate the functional changes of microglia, several factors released from microglia under pathological conditions were analyzed at mRNA level by semi-quantitative PCR analyses using primary cultured microglia from mouse brain. Activated microglia can be involved in neuroprotection both by blocking pro-inflammatory response and producing more neurotrophic factors and anti-inflammatory cytokines. Again, to activate microglia, low (50 μ M)

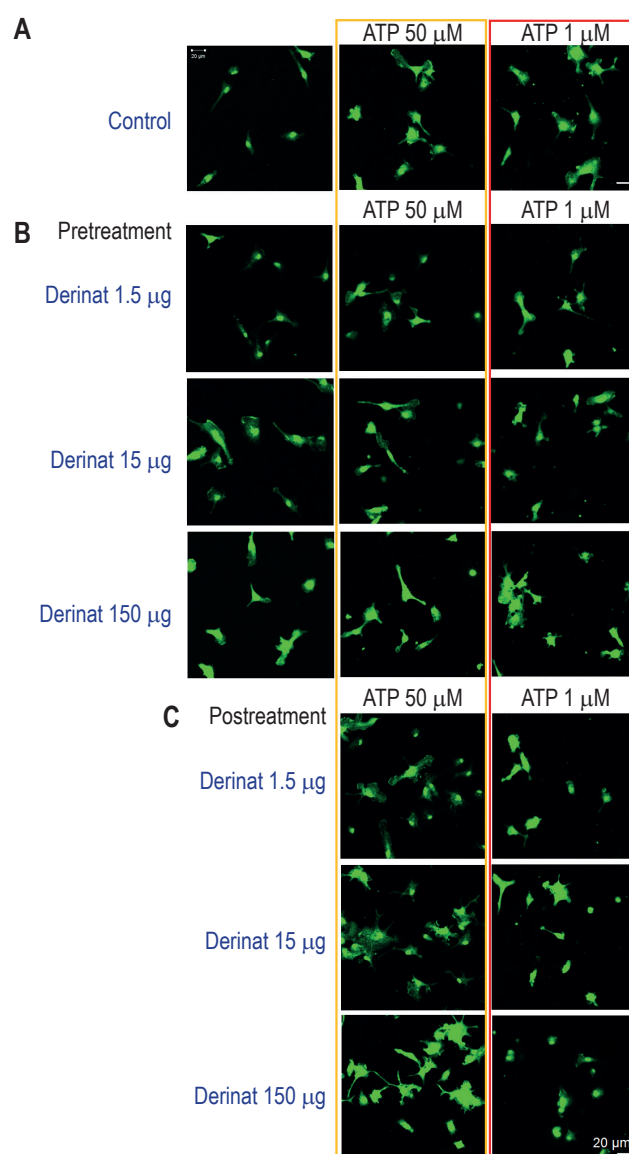


Figure 3. Effect of ATP, pre- and post-treatment of Derinat on Iba1-staining of primary cultured microglia

Note. (A) Effect of ATP (50 μ M and 1 mM) on Iba1-staining (green) of primary cultured microglia. (B) Effect of Derinat (1.5, 15, and 150 μ g/L) before application of ATP (50 μ M and 1 mM). (C) Effect of Derinat (1.5, 15, and 150 μ g/L) after application of ATP (50 μ M and 1 mM).

or high concentration (1 mM) ATP was applied for 24 h. Considering the therapeutic application, Derinat at low (1.5 μ M) or high (150 μ M) concentration was then applied and the cells were incubated for 24 h. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) was decreased by 1 mM ATP, which was recovered by both low and high concentration of Derinat (Figure 4A). Tissue plasminogen activator (tPA), a protein involved in the breakdown of blood clots, was decreased by both low and high concentration

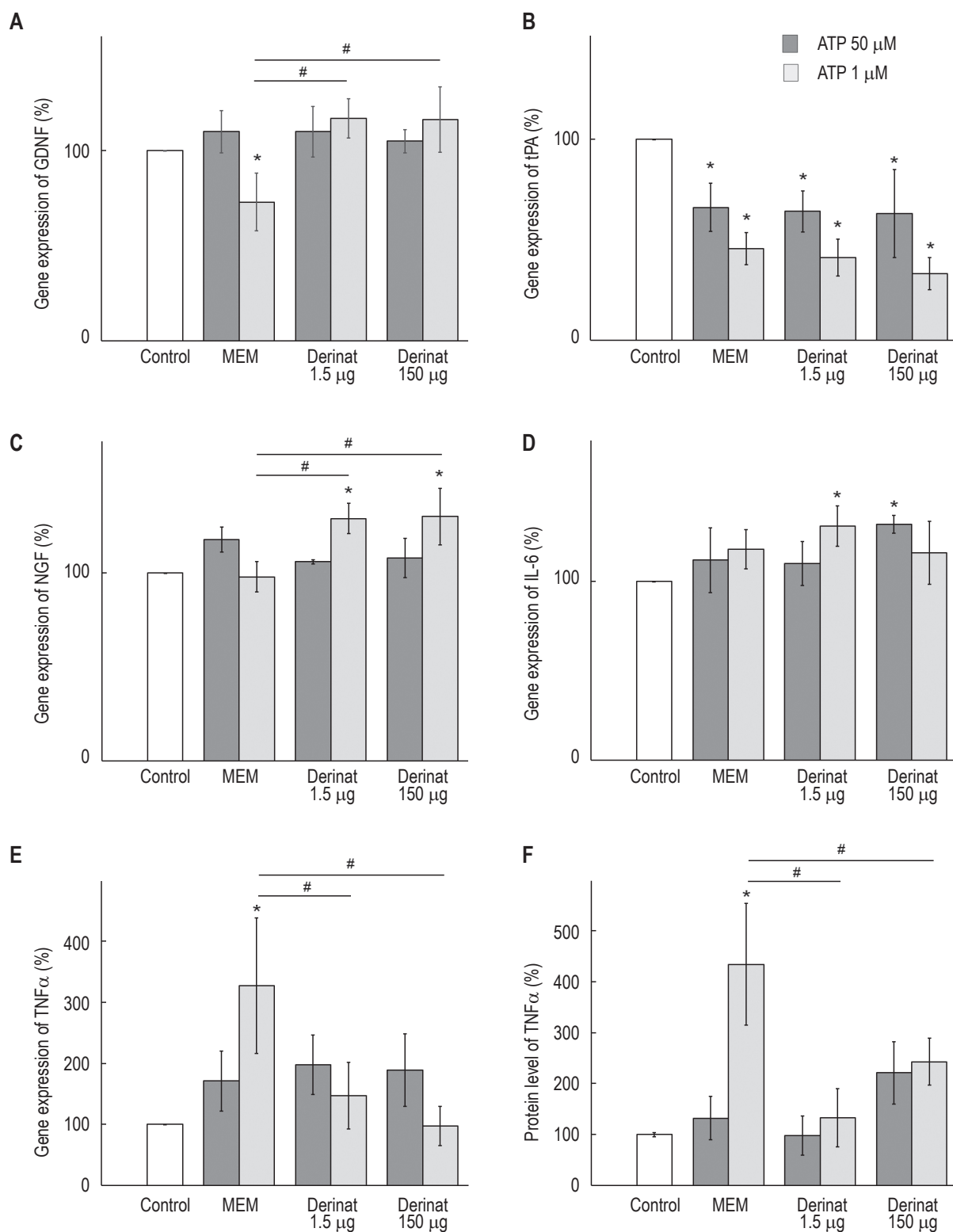


Figure 4. Effects of Derinat on the expression level of neurotrophic factors, tissue plasminogen factors (tPA), and cytokines in primary cultured mouse microglia

Note. (A) Relative expression level of GDNF mRNA. (B) Relative expression level of tPA mRNA. (C) Relative expression level of GDNF mRNA. (B) Relative expression level of NGF mRNA. (D) Relative expression level of IL-6 mRNA. mRNAs were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. (E) Relative expression level of TNFα mRNA. (F) Protein level of TNFα assessed by ELISA. MEM: Modified Eagle Medium. *, $p < 0.05$ compared to control. #, $p < 0.05$ compared to without Derinat.

of ATP. With post-treatment of Derinat even inhibited the tPA mRNA level (Figure 4B). Nerve growth factor (NGF) was not affected by ATP, however, application of Derinat, both low and high concentration, increased NGF mRNA significantly (Figure 4C). As for interleukin (IL)-6, ATP with low and high concentration did not affect, however, 1 μ M ATP-induced IL-6 mRNA was augmented by low concentration of Derinat, while 50 μ M ATP-induced IL-6 mRNA was augmented by high concentration of Derinat (Figure 4D). One of the typical pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor (TNF)- α , was significantly augmented in mRNA by 1 mM ATP, which was significantly prevented by both low and high concentration of Derinat (Figure 4E). To confirm the inhibitory effect of Derinat on TNF α , the protein level of TNF α was also investigated by ELISA. Similar to mRNA analyses, production of TNF α protein was significantly augmented by 1 mM ATP, but it was completely prevented by both low and high concentration of Derinat (Figure 4F).

Discussion

The present study suggests that Derinat may have immunomodulatory and neuroprotective effects. Previously, the TBI model was successfully created and the effects of Derinat on behavioral reactions were investigated at days 1, 7, and 14 [20]. In the current study, it became again obvious that Derinat administration significantly reduced the proportion of injured areas in all three days at 1, 7, and 14. The previous studies have reported that the most prominent amount of injury was observed on the first day after the TBI, and that the amount of injury decreased on the 7th day. In the present study as well, the proportion of damaged areas tended to decrease on day 7 compared to day 1, but it is interesting that the proportion of areas increased again on day 14. In the future, it will be useful to investigate the effects of Derinat in long-term TBI treatment by preparing a group with a longer days after TBI until sacrifice. In addition, though the administration period of Derinat was limited until 74 hours after the TBI in this experiment, designing a plan to administer Derinat for a longer period of time after the TBI will be interesting to see whether more therapeutic effects are observed.

In the TBI, microglia can produce neuroprotective factors, clear cellular debris and orchestrate neurorestorative processes that are beneficial for neurological recovery after TBI. However, microglia can also become dysregulated and can produce pro-inflammatory and cytotoxic mediators [13] that hinder CNS repair and contribute to neuronal dysfunction and cell death. The dual role of microglial

activation in promoting beneficial and detrimental effects on neurons is often accounted for by their polarization state, such as M1-like and M2-like, and functional responses after injury [52]. As an example, modulating microglia polarization through SIRT1-mediated deacetylation of the HMGB1/NF- κ B pathway and attenuation of the inflammatory response by omega-3 polyunsaturated fatty acid was reported [10]. Recently a focused study identified several physiologic processes within microglia after TBI, demonstrating the capability of longitudinal transcriptional profiling to uncover potential cell-specific targets for the treatment of TBI [59].

Previous studies have reported that microglial activation was observed by examining Iba1 expression after TBI [25, 30, 75], and indeed microglial activation in the cortex of animal model was suggested by fluorescent staining of microglia/invading macrophage with anti-Iba1 antibody (Figure 1). Compared with the control group, the non-administered group showed the Iba1 staining with stronger fluorescence on the 7th day, while it was attenuated on the 14th day (Figure 1D). Microglia are largely responsible for perpetuating the injury-induced inflammatory response but in the developing brain they play beneficial roles in both normal and disease states. Following closed head injury in the neonate rat, depletion of microglia with intracerebral injections of liposomes containing clodronate was associated with an increase in neurodegeneration in the early post-injury period (3 days), suggesting that activation of microglia may be beneficial and important for removal of dying neurons in the immature TBI [29]. In the present study, using adult rats we observed more morphologically activated microglia in reduced TBI area by Derinat, indicating activation of microglia may play beneficial role. On the contrary, chronic phase removal of neurotoxic microglia after TBI using colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors markedly reduced chronic neuroinflammation and associated neurodegeneration [31]. As for the transition time from beneficial to toxic role of microglia, it may be necessary to define the time-dependent changes more precisely. It may be interesting to see the effects of Derinat with microglial depletion in the future.

GFAP is an astrocyte-specific substance and is used as an activity marker for astrocytes in immunostaining [16, 58, 64, 73]. Although TBI increased GFAP, no effect of Derinat administration on astrocytes in cerebral cortex was observed in this experiment due to the low expression of GFAP (data not shown). On the other hand, in the hippocampus neither Iba1 nor GFAP staining showed any effect

by Derinat administration (Figure 1G). It has been reported that astrocytic edema is a secondary and fatal symptom of TBI, and that inhibition of vasopressin 1a receptor suppresses GFAP elevation and is useful for prevention and treatment of cerebral edema [62]. In addition, there is a report that cytotoxic cerebral edema occurs after TBI due to the increase of NF- κ B in astrocytes [38]. Therefore, we need to further continue to investigate the action of Derinat on astrocytes.

As in our previous studies, 8-oxo-G was used as a DNA damage marker [24, 60, 70, 72, 90], and TBI changes guanine to 8-oxo-G under oxidative stress and accumulates it [48, 54]. From our results, Derinat suppressed DNA damage on both the 7th and 14th days (Figure 2). Further research on the mechanism how Derinat suppress oxidative stress is needed.

In vitro study using mouse primary cultured microglia, the administration of Derinat altered the morphology of microglia compared to the control group (Figure 3). The fluorescence intensity of Iba-1 staining became stronger and the size of microglial became larger depending on the concentration of Derinat. It is important to know which concentration of Derinat *in vitro* study corresponds to the one *in vivo*, to understand the mechanism of therapeutic effects induced by Derinat.

To activate microglia and induce an inflammatory response, ATP was used, because it is one of the substances produced by TBI [37] and a typical microglial activator [71]. In TBI, it has been reported that microglia converge to the injured site rapidly and autonomously without cell movement [69], and this chemotactic reaction can be mimicked by administration of ATP [19]. When Derinat was administered before and after the addition of ATP, Derinat before the addition of ATP did not significantly change the state of microglia (Figure 3B). On the other hand, post-treatment of Derinat affected the morphology of microglia in a dose-dependent manner (Figure 3C). At least this result suggest that Derinat affect microglia morphologically under the injured condition and enlarged and morphologically activated microglia does not necessarily suggest inflammatory or harmful condition.

Not only morphological changes, functional changes were investigated with primary cultured microglia. Certain microglial receptors have been implicated in TBI pathology, including fractalkine receptor (CX3CR1), purinergic receptor (P2Y12R), Toll-like receptor (TLR4), scavenger receptors, tumor necrosis factor receptor (TNF1R), interleukin receptor (IL-1R), complement receptors, and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) [92].

Also, the transient receptor potential cation channels (TRP channels), TRPV1 and TRPA1, are polymodal receptors that are activated by a variety of stimuli associated with TBI, leading to the release of neuropeptides such as substance P (SP). SP augments many aspects of the classical inflammatory response via activation of microglia and astrocytes [15]. Though we have not analyzed whether or not Derinat affects the expressions of these receptors, it may be useful to see in the future. It was also suggested that TBI may increase the microglial-derived microparticles with pro-inflammatory mediators, interleukin-1 and microRNA-155, being sufficient to initiate neuroinflammation [45]. It will be also interesting if the DNA substance like Derinat can increase the microglial-derived microparticles.

As a beneficial role of microglia, upregulation of microRNA-124 which is a brain specific miRNA that is highly expressed in microglia, was reported to induce M2 polarization of microglia through inhibiting TLR4 pathway, improving hippocampal neurogenesis and functional recovery after brain injury. The M2 polarization of microglia might be a strategy to improve the outcome of TBI [91]. More recently, astrocyte-derived exosomes enriched with miR-873a-5p has been reported to inhibit neuroinflammation via microglia phenotype modulation after TBI [53]. The effect C-C chemokine receptor 5 (CCR5) may be a therapeutic target for recovery after TBI as well [39]. In the future, effects of Derinat on these factors may help understand the mechanisms of nucleotide drugs for TBI.

In our study, GDNF has been used to study neuroprotective effects after TBI [18, 35, 78, 79, 88]. NGF is also drawing attention in investigating the neuroprotective effect after TBI [55, 56, 94]. Increased expression of GDNF and NGF has a neuroprotective effect, which has a positive effect on the treatment of TBI. It has been reported that intranasal administration of NGF improves cognitive function after TBI, although the mechanism of action is unknown [56]. As mentioned in the Introduction, similar memory improvement was clarified by administration of Derinat [20]. As TBI treatments, many means have been proposed, such as administration of transplantation of bone marrow stromal cells [78], utilization of ginsenoside contained in ginseng [35], administration of histone diacetylase inhibitor [55], granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) [79], quercetine [21], erythropoietin, and a pleiotropic cytokine produced in the kidney and CNS [76]. Since an increase in GDNF, NGF, or brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been reported for these treatments as well, the

administration of Derinat can also be an alternative therapy.

tPA promotes neural remodeling in the CNS and also has a thrombolytic effect, so it is used as a standard treatment for ischemic stroke at an early stage [27, 42, 47, 66]. On the other hand, it has also been reported that upregulation of tPA after TBI may cause loss of cerebrovascular self-regulation due to neurotoxicity induced by overactivation of NMDA receptors and intracranial hemorrhage [2, 3, 4, 33, 65, 66]. In the present study, the expression level of tPA was decreased by ATP treatment, and no effect of Derinat was observed. Using the controlled cortical impact model [61], administration of tPA by intranasal treatment to rats 7 days after TBI treatment improved cognitive function and increased BDNF [66]. It has also been reported that treatment with the tPA variant (tPA S481A) can limit the neurotoxicity caused by NMDA receptor activation by suppressing the upregulation of the ERK isoform of mitogen-activated protein kinase (MAPK) [4, 33]. Since Derinat had no effect on tPA *in vitro*, TBI treatment by simultaneous administration of tPA containing mutants and of Derinat *in vivo* may be considered in the future.

Increased IL-6 has multiple effects such as increased glucose uptake, increased fatty acidation, and anti-inflammatory effect [81]. Decreased IL-6 expression reduces post-TBI cerebral edema [89]. There are reports that plasma IL-6 levels are associated with the development of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in patients with severe TBI [1]. On the other hand, it has been pointed out that there is a contradiction on the relationship between TBI and IL-6 [46]. In the present study, the low concentration of Derinat (1.5 μ M) in the presence of 1 mM ATP or high concentration of Derinat (150 μ M) in the presence of 50 μ M ATP increased IL-6 mRNA compared to the control group. Though favorable and unfavorable effects of IL-6 are expected from previous studies, the outcome of the effect of Derinat is likely to be favourable. Indeed, microglia in the mammalian brain can be manipulated to adopt a neuroprotective and pro-regenerative phenotype that can aid repair and alleviate the cognitive deficits arising from brain injury in IL-6-dependent manner [86]. On the other hand, it has also been reported that the -174 C/G gene polymorphism of IL-6 causes a significant difference in short-term results in patients with severe TBI [17]. Therefore, the therapeutic effect of IL-6 under various conditions will be required in the future.

TNF α is an important factor involved in various stages of inflammatory reaction and nerve damage in TBI, and is released by microglia and astrocytes [12, 83]. In the present study, both real-time PCR and

ELISA have shown that Derinat administration significantly reduced TNF α levels. Candidates for TBI treatment include the use of the selective TNF α inhibitor, etanercept [11, 82, 83], because activated subtype of microglia (similar to M1 type of macrophage) produces higher levels of TNF α [12]. Regarding the inhibitory effect of Derinat on TNF α , additional studies on the specificity of Derinat on a microglial subtype might be interesting.

Many substances have been listed as biomarkers for TBI [80]. In investigating the damage caused by TBI, the effects of substances such as c-tau, ferritin, -actin, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and porphobilinogen deaminase (PBGD) [80] were investigated. NIX, also called BNIP3L (Bcl-2/E1B-19K-interacting protein 3-like), belonging to the Bcl-2 family and being considered a proapoptotic protein [57], and neutral sphingomyelinase inhibitors [44], are also likely to play a neuroprotective role in TBI through autophagy and apoptosis pathways or by attenuating the release of microparticles and phosphorylation of p38 MAPK and ERK1/2. The effects of Derinat on these signaling may also helpful to understand the protective actions in the future.

Conclusion

Injection of sodium salt of DNA isolated from the soft roes of Russian sturgeon followed by experimental TBI attenuates the area of brain damage via modulation of immune response of microglia and subsequently inhibiting the accumulation of oxidative stress. The future subject will be to investigate more precise mechanism with molecular or genetic level. Furthermore, it will be useful if similar sodium DNA from other natural sources are also effective. If so, these nucleic acid drugs might become potential therapeutic drugs or supplemental subjects against oxidative stress-induced disorders in the future.

Acknowledgments

We appreciate Mrs. Elli Kaprina (Technomedservis, Moscow, Russia) for supplying Derinat. This work was initiated by an agreement on academic cooperation between Faculty of pharmaceutical sciences, Graduate school of Pharmaceutical Sciences and School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu university, Japan and Federal State Budgetary Scientific Institution, Institute of Experimental Medicine, (St. Petersburg), Russia. We also appreciate the technical assistance from The Research Support Center, Research Center for Human Disease Modeling, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences.

References

1. Aisiku I.P., Yamal J.M., Doshi P., Benoit J.S., Gopinath S., Goodman J.C., Robertson C.S. Plasma cytokines IL-6, IL-8, and IL-10 are associated with the development of acute respiratory distress syndrome in patients with severe traumatic brain injury. *Crit. Care.*, 2016, Vol. 20, 288. doi: 10.1186/s13054-016-1470-7.
2. Armstead W.M., Bohman L.E., Riley J., Yarovoi S., Higazi A.A., Cines D.B. tPA-S(481)A prevents impairment of cerebrovascular autoregulation by endogenous tPA after traumatic brain injury by upregulating p38 MAPK and inhibiting ET-1. *J. Neurotrauma*, 2013, Vol. 30, no. 22, pp. 1898-1907.
3. Armstead W.M., Kiessling J.W., Riley J., Cines D.B., Higazi A.A. tPA contributes to impaired NMDA cerebrovasodilation after traumatic brain injury through activation of JNK MAPK. *Neurol. Res.*, 2011, Vol. 33, no. 7, pp. 726-733.
4. Armstead W.M., Riley J., Yarovoi S., Cines D.B., Smith D.H., Higazi A.A. tPA-S481A prevents neurotoxicity of endogenous tPA in traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 2012, Vol. 29, no. 9, 1794-1802.
5. Başkaya M.K., Doğan A., Temiz C., Dempsey R.J. Application of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to evaluate injury volume after controlled cortical impact brain injury: role of brain edema in evolution of injury volume. *J. Neurotrauma*, 2000, Vol. 17, no. 1, pp. 93-99.
6. Benedek A., Móricz K., Jurányi Z., Gigler G., Lévy G., Hársing L.G. Jr., Mátyus P., Szénási G., Albert M. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.*, 2006, Vol. 1116, no. 1, pp. 159-165.
7. Beppu K., Kosai Y., Kido M.A., Akimoto N., Mori Y., Kojima Y., Fujita K., Okuno Y., Yamakawa Y., Ifuku M., Shinagawa R., Nabekura J., Sprengel R., Noda M. Expression, subunit composition, and function of AMPA-type glutamate receptors are changed in activated microglia; possible contribution of GluA2 (GluR-B)-deficiency under pathological conditions. *Glia*, 2013, Vol. 61, no. 6, pp. 881-891.
8. Blennow K., Brody D.L., Kochanek P.M., Levin H., McKee A., Ribbers G.M., Yaffe K., Zetterberg H. Traumatic brain injuries. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2016, Vol. 2, 16084. doi: 10.1038/nrdp.2016.84.
9. Cantu D., Walker K., Andresen L., Taylor-Weiner A., Hampton D., Tesco G., Dulla C.G. Traumatic brain injury increases cortical glutamate network activity by compromising GABAergic control. *Cereb. Cortex*, 2015, Vol. 25, no. 8, pp. 2306-2320.
10. Chen X., Chen C., Fan S., Wu S., Yang F., Fang Z., Fu H., Li Y. Omega-3 polyunsaturated fatty acid attenuates the inflammatory response by modulating microglia polarization through SIRT1-mediated deacetylation of the HMGB1/NF- κ B pathway following experimental traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation*, 2018, Vol. 15, no. 1, 116. doi: 10.1186/s12974-018-1151-3.
11. Cheong C.U., Chang C.P., Chao C.M., Cheng B.C., Yang C.Z., Chio C.C. Etanercept attenuates traumatic brain injury in rats by reducing brain TNF- α contents and by stimulating newly formed neurogenesis. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, 620837. doi: 10.1155/2013/620837.
12. Chio C.C., Lin M.T., Chang C.P. Microglial activation as a compelling target for treating acute traumatic brain injury. *Curr. Med. Chem.*, 2015, Vol. 22, no. 6, pp. 759-770.
13. Chiu C.C., Liao Y.E., Yang L.Y., Wang J.Y., Tweedie D., Karnati H.K., Greig N.H., Wang J.Y. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *J. Neurosci. Methods*, 2016, Vol. 272, pp. 38-49.
14. Clark D.P.Q., Perreau V.M., Shultz S.R., Brady R.D., Lei E., Dixit S., Taylor J.M., Beart P.M., Boon W.C. Inflammation in Traumatic Brain Injury: Roles for toxic A1 astrocytes and microglial-astrocytic crosstalk. *Neurochem. Res.*, 2019, Vol. 44, no. 6, pp. 1410-1424.
15. Corrigan F., Mander K.A., Leonard A.V., Vink R. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *J. Neuroinflammation*, 2016, Vol. 13, no. 1, 264. doi: 10.1186/s12974-016-0738-9.
16. Cotrina M.L., Chen M., Han X., Iliff J., Ren Z., Sun W., Hagemann T., Goldman J., Messing A., Nedergaard M. Effects of traumatic brain injury on reactive astrogliosis and seizures in mouse models of Alexander disease. *Brain Res.*, 2014, Vol. 1582, pp. 211-219.
17. Dalla Libera A.L., Regner A., de Paoli J., Centenaro L., Martins T.T., Simon D. IL-6 polymorphism associated with fatal outcome in patients with severe traumatic brain injury. *Brain Inj.*, 2011, Vol. 25, no. 4, pp. 365-336.
18. Daoud H., Alharfi I., Alhelali I., Charyk Stewart T., Qasem H., Fraser D.D. Brain injury biomarkers as outcome predictors in pediatric severe traumatic brain injury. *Neurocrit. Care*, 2014, Vol. 20, no. 3, pp. 427-435.
19. Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J.V., Zuo Y., Jung S., Littman D.R., Dustin M.L., Gan W.B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat. Neurosci.*, 2005, Vol. 8, no. 6, pp. 752-758.
20. Dmitrienko E.V., Filatenkova T.A., Rybakina E.G., Korneva E.A. Behavioral reactions of animals after experimental traumatic brain injury: Effects of the nucleotide drug nature. *Bulletin of St. Petersburg University*, 2014, Vol. 11, no. 3, pp. 180-191.
21. Du G., Zhao Z., Chen Y., Li Z., Tian Y., Liu Z., Liu B., Song J. Quercetin protects rat cortical neurons against traumatic brain injury. *Mol. Med. Rep.*, 2018, Vol. 17, no. 6, pp. 7859-7865.

22. Finan J.D. Biomechanical simulation of traumatic brain injury in the rat. *Clin. Biomech.*, 2019, Vol. 64, pp. 114-121.
23. Fomicheva E.E., Filatenkova T.A., Shanin S.N., Rybakina E.G. Stress-induced changes in the functional activity of the neuroendocrine system: the modulatory activity of derinat. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2010, Vol. 40, no. 4, pp. 397-401.
24. Fujita K., Seike T., Yutsudo N., Ohno M., Yamada H., Yamaguchi H., Sakumi K., Yamakawa Y., Kido M.A., Takaki A., Katafuchi T., Tanaka Y., Nakabeppu Y., Noda M. Hydrogen in drinking water reduces dopaminergic neuronal loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One*, 2009, Vol. 4, no. 9, e7247. doi: 10.1371/journal.pone.0007247.
25. Gatson J.W., Liu M.M., Abdelfattah K., Wigginton J.G., Smith S., Wolf S., Minei J.P. Resveratrol decreases inflammation in the brain of mice with mild traumatic brain injury. *J. Trauma Acute Care Surg.*, 2013, Vol. 74, no. 2, pp. 470-475.
26. Ghajar J. Traumatic brain injury. *Lancet*, 2000, Vol. 356, no. 9233, pp. 923-929.
27. Grummisch J.A., Jadavji N.M., Smith P.D. tPA promotes cortical neuron survival via mTOR-dependent mechanisms. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2016, Vol. 74, pp. 25-33.
28. Hagino Y., Kariura Y., Manago Y., Amano T., Wang B., Sekiguchi M., Nishikawa K., Aoki S., Wada K., Noda M. Heterogeneity and potentiation of AMPA type of glutamate receptors in rat cultured microglia. *Glia*, 2004, Vol. 47, no. 1, pp. 68-77.
29. Hanlon L.A., Raghupathi R., Huh J.W. Depletion of microglia immediately following traumatic brain injury in the pediatric rat: Implications for cellular and behavioral pathology. *Exp. Neurol.*, 2019, Vol. 316, pp. 39-51.
30. Harvey L.D., Yin Y., Attarwala I.Y., Begum G., Deng J., Yan H.Q., Dixon C.E., Sun D. Administration of DHA reduces endoplasmic reticulum stress-associated inflammation and alters microglial or macrophage activation in traumatic brain injury. *ASN Neuro*, 2015, Vol. 7, no. 6, 1759091415618969. doi: 10.1177/1759091415618969.
31. Henry R.J., Ritzel R.M., Barrett J.P., Doran S.J., Jiao Y., Leach J.B., Szeto G.L., Wu J., Stoica B.A., Faden A.I., Loane D.J. Microglial depletion with CSF1R inhibitor during chronic phase of experimental traumatic brain injury reduces neurodegeneration and neurological deficits. *J. Neurosci.*, 2020, Vol. 40, no. 14, pp. 2960-2974.
32. Hide I., Tanaka M., Inoue A., Nakajima K., Kohsaka S., Inoue K., Nakata Y. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor- α release from rat microglia. *J. Neurochem.*, 2000, Vol. 75, no. 3, pp. 965-972.
33. Hijazi N., Abu Fanne R., Abramovitch R., Yarovoi S., Higazi M., Abdeen S., Basheer M., Maraga E., Cines D.B., Higazi A.A. Endogenous plasminogen activators mediate progressive intracerebral hemorrhage after traumatic brain injury in mice. *Blood*, 2015, Vol. 125, no. 16, pp. 2558-2567.
34. Hsu W.L., Lu J.H., Noda M., Wu C.Y., Liu J.D., Sakakibara M., Tsai M.H., Yu H.S., Lin M.W., Huang Y.B., Yan S.J., Yoshioka T. Derinat protects skin against ultraviolet-B (UVB)-induced cellular damage. *Molecules*, 2015, Vol. 20, no. 11, pp. 20297-20311.
35. Hu B.Y., Liu X.J., Qiang R., Jiang Z.L., Xu L.H., Wang G.H., Li X., Peng B. Treatment with ginseng total saponins improves the neurorestoration of rat after traumatic brain injury. *J. Ethnopharmacol.*, 2014, Vol. 155, no. 2, pp. 1243-1255.
36. Imai Y., Iyata I., Ito D., Ohsawa K., Kohsaka S. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, Vol. 224, no. 3, pp. 855-862.
37. Jassam Y.N., Izzy S., Whalen M., McGavern D.B., El Khoury J. Neuroimmunology of traumatic brain injury: time for a paradigm shift. *Neuron*, 2017, Vol. 95, no. 6, pp. 1246-1265.
38. Jayakumar A.R., Tong X.Y., Ruiz-Cordero R., Bregy A., Bethea J.R., Bramlett H.M., Norenberg M.D. Activation of NF- κ B mediates astrocyte swelling and brain edema in traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 2014, Vol. 31, no. 14, pp. 1249-1257.
39. Joy M.T., Ben Assayag E., Shabashov-Stone D., Liraz-Zaltsman S., Mazzitelli J., Arenas M., Abduljawad N., Kliper E., Korczyn A.D., Thareja N.S., Kesner E.L., Zhou M., Huang S., Silva T.K., Katz N., Bornstein N.M., Silva A.J., Shohami E., Carmichael S.T. CCR5 Is a therapeutic target for recovery after stroke and traumatic brain injury. *Cell*, 2019, Vol. 176, no. 5, pp. 1143-1157.e13.
40. Karve I.P., Taylor J.M., Crack P.J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br. J. Pharmacol.*, 2016, Vol. 173, no. 4, pp. 692-702.
41. Kettenmann H., Hanisch U.K., Noda M., Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.*, 2011, Vol. 91, no. 2, pp. 461-553.
42. Kim E.J., Kim S.Y., Lee J.H., Kim J.M., Kim J.S., Byun J.I., Koo B.N. Effect of isoflurane post-treatment on tPA-exaggerated brain injury in a rat ischemic stroke model. *Korean J. Anesthesiol.*, 2015, Vol. 68, no. 3, pp. 281-286.
43. Krukowski K., Chou A., Feng X., Tiret B., Paladini M.S., Riparip L.K., Chaumeil M.M., Lemere C., Rosi S. Traumatic brain injury in aged mice induces chronic microglia activation, synapse loss, and complement-dependent memory deficits. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 12, 3753. doi: 10.3390/ijms19123753.

44. Kumar A., Henry R.J., Stoica B.A., Loane D.J., Abulwerdi G., Bhat S.A., Faden A.I. Neutral sphingomyelinase inhibition alleviates Ips-induced microglia activation and neuroinflammation after experimental traumatic brain injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2019, Vol. 368, no. 3, pp. 338-352.
45. Kumar A., Stoica B.A., Loane D.J., Yang M., Abulwerdi G., Khan N., Kumar A., Thom S.R., Faden A.I. Microglial-derived microparticles mediate neuroinflammation after traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation*, 2017, Vol. 14, 47. doi: 10.1186/s12974-017-0819-4.
46. Kumar R.G., Diamond M.L., Boles J.A., Berger R.P., Tisherman S.A., Kochanek P.M., Wagner A.K. Acute CSF interleukin-6 trajectories after TBI: associations with neuroinflammation, polytrauma, and outcome. *Brain Behav. Immun.*, 2015, Vol. 45, pp. 253-262.
47. Lee S.H., Ko H.M., Kwon K.J., Lee J., Han S.H., Han D.W., Cheong J.H., Ryu J.H., Shin C.Y. tPA regulates neurite outgrowth by phosphorylation of LRP5/6 in neural progenitor cells. *Mol. Neurobiol.*, 2014, Vol. 49, no. 1, pp. 199-215.
48. Lewén A., Sugawara T., Gasche Y., Fujimura M., Chan P.H. Oxidative cellular damage and the reduction of APE/Ref-1 expression after experimental traumatic brain injury. *Neurobiol. Dis.*, 2001, Vol. 8, no. 3, pp. 380-390.
49. Lin B.S., Wang C.C., Chang M.H., Chio C.C. Evaluation of traumatic brain injury by optical technique. *BMC Neurol.*, 2015, Vol. 15, 202. doi: 10.1186/s12883-015-0465-3.
50. Lindh C., Wennersten A., Arnberg F., Holmin S., Mathiesen T. Differences in cell death between high and low energy brain injury in adult rats. *Acta Neurochir.*, 2008, Vol. 150, no. 12, pp. 1269-1275.
51. Liu J., Rybakina E.G., Korneva E.A., Noda M. Effects of Derinat on ischemia-reperfusion-induced pressure ulcer mouse model. *J. Pharmacol. Sci.*, 2018, Vol. 138, no. 2, pp. 123-130.
52. Loane D.J., Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp. Neurol.*, 2016, Vol. 275, no. 3, pp. 316-327.
53. Long X., Yao X., Jiang Q., Yang Y., He X., Tian W., Zhao K., Zhang H. Astrocyte-derived exosomes enriched with miR-873a-5p inhibit neuroinflammation via microglia phenotype modulation after traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation*, 2020, Vol. 17, no. 1, 89. doi: 10.1186/s12974-020-01761-0.
54. Lorente L., Martín M.M., González-Rivero A.F., Pérez-Cejas A., Abreu-González P., Ramos L., Argueso M., Cáceres J.J., Solé-Violán J., Alvarez-Castillo A., Jiménez A., García-Marín V. Association between DNA and RNA oxidative damage and mortality of patients with traumatic brain injury. *Neurocrit. Care*, 2020, Vol. 32, no. 3, pp. 790-795.
55. Lu J., Frerich J.M., Turtzo L.C., Li S., Chiang J., Yang C., Wang X., Zhang C., Wu C., Sun Z., Niu G., Zhuang Z., Brady R.O., Chen X. Histone deacetylase inhibitors are neuroprotective and preserve NGF-mediated cell survival following traumatic brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, Vol. 110, no. 26, pp. 10747-10752.
56. Lv Q., Lan W., Sun W., Ye R., Fan X., Ma M., Yin Q., Jiang Y., Xu G., Dai J., Guo R., Liu X. Intranasal nerve growth factor attenuates tau phosphorylation in brain after traumatic brain injury in rats. *J. Neurol. Sci.*, 2014, Vol. 345, no. 1-2, pp. 48-55.
57. Ma J., Ni H., Rui Q., Liu H., Jiang F., Gao R., Gao Y., Li D., Chen G. Potential roles of NIX/BNIP3L pathway in rat traumatic brain injury. *Cell Transplant.*, 2019, Vol. 28, no. 5, pp. 585-595.
58. Madathil S.K., Carlson S.W., Brelsfoard J.M., Ye P., D'Ercole A.J., Saatman K.E. Astrocyte-specific overexpression of insulin-like growth factor-1 protects hippocampal neurons and reduces behavioral deficits following traumatic brain injury in mice. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 6, e67204. doi: 10.1371/journal.pone.0067204.
59. Makinde H.M., Just T.B., Gadhvi G.T., Winter D.R., Schwulst S.J. Microglia adopt longitudinal transcriptional changes after traumatic brain injury. *J. Surg. Res.*, 2020, Vol. 246, pp. 113-122.
60. Markkanen E. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage. *DNA Repair*, 2017, Vol. 59, pp. 82-105.
61. Marklund N. Rodent models of traumatic brain injury: methods and challenges. *Methods Mol. Biol.*, 2016, Vol. 1462, pp. 29-46.
62. Marmarou C.R., Liang X., Abidi N.H., Parveen S., Taya K., Henderson S.C., Young H.F., Filippidis A.S., Baumgarten C.M. Selective vasopressin-1a receptor antagonist prevents brain edema, reduces astrocytic cell swelling and GFAP, V1aR and AQP4 expression after focal traumatic brain injury. *Brain Res.*, 2014, Vol. 1581, pp. 89-102.
63. McKee A.C., Robinson M.E. Military-related traumatic brain injury and neurodegeneration. *Alzheimers Dementia*, 2014, Vol. 10, no. 3, pp. S242-S253.
64. McMahon P.J., Panczykowski D.M., Yue J.K., Puccio A.M., Inoue T., Sorani M.D., Lingsma H.F., Maas A.I., Valadka A.B., Yuh E.L., Mukherjee P., Manley G.T., Okonkwo D.O. TRACK-TBI Investigators. Measurement of the glial fibrillary acidic protein and its breakdown products GFAP-BDP biomarker for the detection of traumatic brain injury compared to computed tomography and magnetic resonance imaging. *J. Neurotrauma*, 2015, Vol. 32, no. 8, pp. 527-33.
65. Medcalf R.L. The traumatic side of fibrinolysis. *Blood*, 2015, Vol. 125, no. 16, pp. 2457-2458.
66. Meng Y., Chopp M., Zhang Y., Liu Z., An A., Mahmood A., Xiong Y. Subacute intranasal administration of tissue plasminogen activator promotes neuroplasticity and improves functional recovery following traumatic brain injury in rats. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 9, e106238. doi: 10.1371/journal.pone.0106238.

67. Mori Y., Tomonaga D., Kalashnikova A., Furuya F., Akimoto N., Ifuku M., Okuno Y., Beppu K., Fujita K., Katafuchi T., Shimura H., Churilov L.P., Noda M. Effects of 3,3',5-triiodothyronine on microglial functions. *Glia*, 2015, Vol. 63, no. 5, pp. 906-920.
68. Needham E.J., Helmy A., Zanier E.R., Jones J.L., Coles A.J., Menon D.K. The immunological response to traumatic brain injury. *J. Neuroimmunol.*, 2019, Vol. 332, pp. 112-125.
69. Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science*, 2005, Vol. 308, no. 5726, pp. 1314-1318.
70. Ohno M., Oka S., Nakabeppu Y. Quantitative analysis of oxidized guanine, 8-oxoguanine, in mitochondrial DNA by immunofluorescence method. *Methods Mol. Biol.*, 2009, Vol. 554, pp. 199-212.
71. Ohsawa K., Kohsaka S. Dynamic motility of microglia: purinergic modulation of microglial movement in the normal and pathological brain. *Glia*, 2011, Vol. 59, no. 12, pp. 1793-1799.
72. Oka S., Ohno M., Tsuchimoto D., Sakumi K., Furuichi M., Nakabeppu Y. Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. *EMBO J.*, 2008, Vol. 27, no. 2, pp. 421-432.
73. Papa L., Silvestri S., Brophy G.M., Giordano P., Falk J.L., Braga C.F., Tan C.N., Ameli N.J., Demery J.A., Dixit N.K., Mendes M.E., Hayes R.L., Wang K.K., Robertson C.S. GFAP outperforms S100 β in detecting traumatic intracranial lesions on computed tomography in trauma patients with mild traumatic brain injury and those with extracranial lesions. *J. Neurotrauma*, 2014, Vol. 31, no. 22, pp. 1815-1822.
74. Perri B.R., Smith D.H., Murai H., Sinson G., Saatman K.E., Raghupathi R., Bartus R.T., McIntosh T.K. Metabolic quantification of lesion volume following experimental traumatic brain injury in the rat. *J. Neurotrauma*, 1997, Vol. 14, no. 1, pp. 15-22.
75. Rowe R.K., Striz M., Bachstetter A.D., Van Eldik L.J., Donohue K.D., O'Hara B.F., Lifshitz J. Diffuse brain injury induces acute post-traumatic sleep. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 1, e82507. doi: 10.1371/journal.pone.0082507.
76. Schober M.E., Requena D.F., Rodesch C.K. EPO improved neurologic outcome in rat pups late after traumatic brain injury. *Brain Dev.*, 2018, Vol. 40, no. 5, pp. 367-375.
77. Scrimgeour A.G., Condlin M.L. Nutritional treatment for traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 2014, Vol. 31, no. 11, pp. 989-999.
78. Shen Q., Yin Y., Xia Q.J., Lin N., Wang Y.C., Liu J., Wang H.P., Lim A., Wang T.H. Bone Marrow Stromal Cells Promote Neuronal Restoration in Rats with Traumatic Brain Injury: Involvement of GDNF Regulating BAD and BAX Signaling. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2016, Vol. 38, no. 2, pp. 748-762.
79. Song S., Kong X., Acosta S., Sava V., Borlongan C., Sanchez-Ramos J. Granulocyte colony-stimulating factor promotes behavioral recovery in a mouse model of traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res.*, 2016, Vol. 94, no. 5, pp. 409-423.
80. Thal S.C., Wyschkon S., Pieter D., Engelhard K., Werner C. Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. *J. Neurotrauma*, 2008, Vol. 25, no. 7, pp. 785-794.
81. Timmerman K.L., Amonette W.E., Markofski M.M., Ansinelli H.A., Gleason E.A., Rasmussen B.B., Mossberg K.A. Blunted IL-6 and IL-10 response to maximal aerobic exercise in patients with traumatic brain injury. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2015, Vol. 115, no. 1, pp. 111-118.
82. Tobinick E., Kim N.M., Reyzin G., Rodriguez-Romanacce H., DePuy V. Selective TNF inhibition for chronic stroke and traumatic brain injury: an observational study involving 629 consecutive patients treated with perispinal etanercept. *CNS Drugs*, 2012, Vol. 26, no. 12, pp. 1051-1070.
83. Tuttolomondo A., Pecoraro R., Pinto A. Studies of selective TNF inhibitors in the treatment of brain injury from stroke and trauma: a review of the evidence to date. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2014, Vol. 8, pp. 2221-2238.
84. Wang Y., Chen D., Chen G. Hyperbaric oxygen therapy applied research in traumatic brain injury: from mechanisms to clinical investigation. *Med. Gas. Res.*, 2014, Vol. 4, 18. doi: 10.1186/2045-9912-4-18.
85. Wang Y., Yue X., Kiesewetter D.O., Niu G., Teng G., Chen X. PET imaging of neuroinflammation in a rat traumatic brain injury model with radiolabeled TSPO ligand DPA-714. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2014, Vol. 41, no. 7, pp. 1440-1449.
86. Willis E.F., MacDonald K.P.A., Nguyen Q.H., Garrido A.L., Gillespie E.R., Harley S.B.R., Bartlett P.F., Schroder W.A., Yates A.G., Anthony D.C., Rose-John S., Ruitenber M.J., Vukovic J. Repopulating microglia promote brain repair in an IL-6-dependent manner. *Cell*, 2020, Vol. 180, no. 5, pp. 833-846.e16.
87. Witcher K.G., Bray C.E., Dziabis J.E., McKim D.B., Benner B.N., Rowe R.K., Kokiko-Cochran O.N., Popovich P.G., Lifshitz J., Eiferman D.S., Godbout J.P. Traumatic brain injury-induced neuronal damage in the somatosensory cortex causes formation of rod-shaped microglia that promote astrogliosis and persistent neuroinflammation. *Glia*, 2018, Vol. 66, no. 12, pp. 2719-2736.
88. Xing P., Ma K., Li L., Wang D., Hu G., Long W. The protection effect and mechanism of hyperbaric oxygen therapy in rat brain with traumatic injury. *Acta Cir. Bras.*, 2018, Vol. 33, no. 4, pp. 341-353.
89. Xu B., Yu D.M., Liu F.S. Effect of siRNA-induced inhibition of IL-6 expression in rat cerebral gliocytes on cerebral edema following traumatic brain injury. *Mol. Med. Rep.*, 2014, Vol. 10, no. 4, pp. 1863-1868.

90. Yamaguchi H., Kajitani K., Dan Y., Furuichi M., Ohno M., Sakumi K., Kang D., Nakabeppu Y. MTH1, an oxidized purine nucleoside triphosphatase, protects the dopamine neurons from oxidative damage in nucleic acids caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Cell Death Differ.*, 2006, Vol. 13, no. 4, pp. 551-563.
91. Yang Y., Ye Y., Kong C., Su X., Zhang X., Bai W., He X. MiR-124 enriched exosomes promoted the M2 polarization of microglia and enhanced hippocampus neurogenesis after traumatic brain injury by inhibiting TLR4 pathway. *Neurochem. Res.*, 2019, Vol. 44, no. 4, pp. 811-828.
92. Younger D., Murugan M., Rama Rao K.V., Wu L.J., Chandra N. Microglia receptors in animal models of traumatic brain injury. *Mol. Neurobiol.*, 2019, Vol. 56, no. 7, pp. 5202-5228.
93. Zhao J., Wang B., Huang T., Guo X., Yang Z., Song J., Zhang M. Glial response in early stages of traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.*, 2019, Vol. 708, 134335. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134335.
94. Zhuang Y.F., Li J. Serum EGF and NGF levels of patients with brain injury and limb fracture. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2013, Vol. 6, no. 5, pp. 383-386.

Авторы:

Корнева Е.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Дмитриенко Е.В. — старший лаборант ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Миямура Сюнпэй — студент бакалавриата, Высшая школа фармацевтических наук, Университет Кюсю, Япония

Акимото Нозоми — доктор наук, научный сотрудник лаборатории патофизиологии, Высшая школа фармацевтических наук, Университет Кюсю, Япония

Нода Мами — доктор наук, доцент, заведующая лабораторией патофизиологии, Высшая школа фармацевтических наук, Университет Кюсю, Япония

Authors:

Korneva E.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Chief Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Dmitrienko E.V., Senior Laboratory Assistant, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Miyamura Shunpei, Undergraduate Student, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Japan

Akimoto Nozomi, PhD, Laboratory Research Assistant, Laboratory of Pathophysiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Japan

Noda Mami, PhD, Associate Professor, Head, Laboratory of Pathophysiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Japan

Поступила 30.07.2021

Принята к печати 29.09.2021

Received 30.07.2021

Accepted 29.09.2021

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ НК-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С КЛЕТКАМИ ТРОФОБЛАСТА И ЦИТОКИНАМИ IL-15 И IL-18

Михайлова В.А.^{1,2}, Гребенкина П.В.¹, Тыщук Е.В.¹, Давыдова А.А.¹,
Загайнова В.А.¹, Коган И.Ю.¹, Сельков С.А.^{1,2}, Соколов Д.И.^{1,2}

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

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Естественные киллеры (НК-клетки) являются лимфоцитами врожденного иммунитета. Дифференцировка НК-клеток находится под контролем клеток микроокружения и продуцируемых ими цитокинов, в том числе IL-2, IL-15 и IL-18. НК-клетки представлены в различных тканях, где они формируют пулы тканерезидентных естественных киллеров, одним из таких пулов являются НК-клетки децидуальной оболочки. Предполагаемым источником клеток для дифференцировки НК-клеток децидуальной оболочки являются НК-клетки периферической крови (pNK). В матке НК-клетки контактируют с клетками трофобласта, что может влиять на их фенотип. Вклад клеток трофобласта и цитокинов IL-2, IL-15 и IL-18 в регуляцию фенотипа pNK-клеток недостаточно изучен. В связи с этим целью работы была оценка влияния клеток трофобласта на фенотип pNK-клеток в условиях культивирования в среде с IL-2, IL-15, IL-18. В работе использовали мононуклеары, полученные из периферической крови здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста, с регулярным менструальным циклом (n = 21). Мононуклеары культивировали в присутствии IL-2 и одного из цитокинов, регулирующих дифференцировку НК-клеток – IL-15 или IL-18. В качестве клеток трофобласта использовали клетки линии JEG-3. Оценивали экспрессию pNK-клетками рецепторов CD45, CD3, CD56, CD14, KIR3DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DS4, NKp44, CD215, CD122, CD127, NKG2D, KIR2DL1, NKG2C. Установлено, для pNK-клеток, прокультивированных в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3, характерна более низкая интенсивность экспрессии рецептора CD56 по сравнению с pNK-клетками, прокультивированными без клеток трофобласта. Эти изменения выявлены в случае культивирования как в среде с IL-15, так и в среде с IL-18. Выявлено сниженное количество NKG2C⁺ pNK-клеток в присутствии клеток трофобласта линии JEG-3 по

Адрес для переписки:

Михайлова Валентина Анатольевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 328-98-50.
E-mail: mva_spb@mail.ru

Address for correspondence:

Mikhailova Valentina A.
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
199034, Russian Federation, St. Petersburg,
Mendeleevskaya line, 3.
Phone: 7 (812) 328-98-50.
E-mail: mva_spb@mail.ru

Образец цитирования:

В.А. Михайлова, П.В. Гребенкина, Е.В. Тыщук, А.А. Давыдова, В.А. Загайнова, И.Ю. Коган, С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Фенотипический профиль НК-клеток периферической крови в условиях культивирования с клетками трофобласта и цитокинами IL-15 и IL-18» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1383-1388.
doi: 10.15789/1563-0625-PPO-2403
© Михайлова В.А. и соавт., 2021

For citation:

V.A. Mikhailova, P.V. Grebenkina, E.V. Tyshchuk, A.A. Davydova, V.A. Zagaynova, I.Yu. Kogan, S.A. Selkov, D.I. Sokolov "Phenotypic profile of peripheral blood NK cells under culturing with trophoblast cells and IL-15 and IL-18 cytokines", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1383-1388.
doi: 10.15789/1563-0625-PPO-2403
DOI: 10.15789/1563-0625-PPO-2403

сравнению с НК-клетками, прокультивированными без клеток трофобласта, при культивировании в среде с IL-15. Выявленные изменения экспрессии CD56 и NKG2C pNK-клетками в присутствии клеток трофобласта противоположны ранее установленным для НК-клеток линии NK-92. Вероятно, помимо клеток трофобласта, моноциты, присутствующие в составе мононуклеаров, под действием цитокинов, могут влиять на фенотип pNK-клеток в использованной модельной системе. Так как моноциты/макрофаги присутствуют в децидуальной оболочке, требуются дальнейшие исследования влияния цитокинов и клеток микроокружения, в том числе моноцитов, на pNK-клетки.

Ключевые слова: НК-клетки, периферическая кровь, трофобласт, IL-15, IL-18, фенотип, CD56

PHENOTYPIC PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD NK CELLS UNDER CULTURING WITH TROPHOBLAST CELLS AND IL-15 AND IL-18 CYTOKINES

Mikhailova V.A.^{a, b}, Grebenkina P.V.^a, Tyshchuk E.V.^a, Davydova A.A.^a, Zagaynova V.A.^a, Kogan I.Yu.^a, Selkov S.A.^{a, b}, Sokolov D.I.^{a, b}

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

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

Abstract. Natural killer cells (NK cells) are innate immunity lymphocytes. NK cell differentiation is controlled by the cellular microenvironment and locally produced cytokines, including IL-2, IL-15 and IL-18. NK cells are present in various tissues, forming pools of tissue-resident NK cells, e.g., decidual NK cell pool. Peripheral blood NK cells (pNK cells) are considered a supposed source of cells for decidual NK cell differentiation. In the uterus, NK cells contact with trophoblast cells, which can affect their phenotype. Contribution of trophoblast cells and IL-2, IL-15 and IL-18 cytokines to the pNK cell phenotype regulation is scarcely studied. In this regard, the aim of our research was to evaluate the effect of trophoblast cells on the phenotype of pNK cells when cultured in medium with IL-2, IL-15, and IL-18. We used mononuclear cells obtained from peripheral blood of healthy non-pregnant women at their reproductive age, with regular menstrual cycle (n = 21). Mononuclear cells were cultured in presence of IL-2, and either of cytokines regulating NK cell differentiation (IL-15, or IL-18). JEG-3 cells were used as trophoblast cells. We evaluated expression of CD45, CD3, CD56, CD14, KIR3DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DS4, NKp44, CD215, CD122, CD127, NKG2D, KIR2DL1, NKG2C receptors by pNK cells. It was found that pNK cells cultured in presence of trophoblast cells (JEG-3 cell line) were characterized by lower intensity of CD56 receptor expression, compared to pNK cells cultured without trophoblast cells. These changes were detected upon culturing both in medium supplied by IL-15, and with IL-18. A reduced number of NKG2C⁺ pNK cells was detected in presence of JEG-3 trophoblast cells, compared to NK cells cultured without trophoblast cells in medium with IL-15. The detected changes in the CD56 and NKG2C expression by pNK cells in presence of trophoblast cells proved to be opposite to those previously detected for NK cells derived from NK-92 cell line. Along with trophoblast cells, the monocytes isolated among mononuclear cells and being affected by cytokines, can apparently influence the phenotype of pNK cells in the model system used. Since monocytes/macrophages are present in decidua, further research is required to study the effect of cytokines and cellular microenvironment, including monocytes, on pNK cells.

Keywords: NK cells, peripheral blood, trophoblast, IL-15, IL-18, phenotype, CD56

This research was supported by the Russian Foundation for Basic Research Grant No. 20-015-00014 (receptor expression assessment), the government program No. AAAA-A20-120041390033-4 (forming the group for trial), the government program No. AAAA-A19-119021290116-1 (cell culturing).

Introduction

Natural killer cells (NK cells) are innate immunity lymphocytes. They are present in the composition of mononuclear cells of the peripheral blood making up to 15% of all lymphoid cells [1]. The differentiation

of NK cells is controlled by the cellular micro-environment and cytokines produced by it, including IL-2, IL-15 and IL-18 [15]. The IL-2 cytokine is an important growth factor for NK cells, since it stimulates their proliferation [14]. The IL-15 cytokine is produced by hematopoietic, dendritic and stromal cells, as well as by monocytes and macrophages. In the course of experiments on a mouse model with IL-15 gene knockout or without receptors to it, a decrease in the number of NK cells could be observed, while the transplantation of donor NK cells led to the death of NK cells in the absence of exogenous IL-15 [7]. The IL-18 cytokine is constitutively produced by dendritic cells, macrophages, neutrophils and epithelial cells [15]. Experiments on a mouse model showed that IL-18 stimulated the expression of IL-2R by NK cells and enhanced the proliferation of NK cells caused by IL-2 [3]. The use of IL-2, IL-15 and IL-18 cytokine combination in the culturing of peripheral blood NK cells (pNK cells) leads to the increase in their number, their cytotoxicity and their expression of CD16 and NKG2D activation receptors [9].

NK cells are present in various tissues, where they form pools of tissue resident NK cells. One of such populations of tissue resident NK cells is formed by decidual NK cells. Decidual NK cells contain lytic granules and express receptors for the molecules of the main histocompatibility complex. However, they do not exhibit a pronounced cytotoxic activity [5]. Their role in the processes of blastocyst implantation and placenta development has been proved [6]. One of the possible sources of decidual NK cells are NK cells migrating from the peripheral blood (pNK) [7]. In the uterus, NK cells come into contact with trophoblast cells, which can affect their phenotype. Cytokines IL-15 and IL-18 are present in the uteroplacental complex and can affect uterine NK cells [8, 13]. The contribution of cellular microenvironment of the decidua and cytokines IL-15 and IL-18 to pNK cell phenotype regulation has not been sufficiently studied. In this regard, **the aim of the research** was to evaluate the effect of trophoblast cells on the phenotype of pNK cells when cultured in medium with IL-2, IL-15, and IL-18.

Materials and methods

Mononuclear cells were obtained from the peripheral blood of healthy nonpregnant women of reproductive age with a regular menstrual cycle ($n = 21$). The exclusion criteria included acute inflammatory diseases, exacerbations of chronic diseases and intake of combined oral contraceptive pills. The average age of the women involved in the research was 29.2 ± 6 years. Cells of the JEG-3 cell line (ATCC, USA) similar in their characteristics to extravillous trophoblast cells of the first trimester of pregnancy were used as trophoblast cells [17].

Trophoblast cells of the JEG-3 cell line (ATCC, USA) were placed in a 96-well flat bottom plate at a concentration of 20,000 cells in 100 μ L a complete cell culture medium (DMEM) (Biolog, Russia). After 24 hours, mononuclear cells were isolated from the peripheral blood by centrifugation in Ficoll solution gradient (density 1.077; Biolog, Russia). The culture medium was removed from the plate wells. Mononuclear cells were then added either to trophoblast cells or to empty wells at a concentration of 100,000 cells in 100 μ L of a complete cell culture medium (DMEM). IL-2 (200 U/mL) was added to all wells; IL-18 (10 ng/mL) or IL-15 (10 ng/mL) (Sigma Aldrich, USA) were added to some of the wells, thus obtaining combinations of IL-2⁺/IL-15⁺ and IL-2⁺/IL-18⁺. The cells were then incubated for 96 hours in a humid environment at 37 °C, 5% CO₂. After incubation the plate was centrifuged for 5 minutes at 200 g and 22 °C, after which the culture medium was removed from the wells, 100 μ L of Versene solution (Biolog, Russia) was added to each well, and the cells were then resuspended. After that, the cells were centrifuged for 5 minutes at 200 g and 22 °C, the Versene solution was removed, and the cells were re-washed in Hanks solution by centrifugation (5 minutes at 200 g, 22 °C). Then the cells were sequentially treated with Fc receptor blocking reagent (MACS, Germany) and monoclonal antibodies to CD45, CD3, CD56, CD14, KIR3DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DS4, NKp44, CD215, CD122, CD127, NKG2D (BD, USA), KIR2DL1, NKG2C (R&D, USA) receptors according to manufacturers' protocol. The cell death was evaluated after culturing by treatment with 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD). It was no more than 2% (BioLegend, USA). Isotypic antibodies (BD, USA and R&D, USA) were used to control the nonspecific binding. Cells untreated with monoclonal antibodies served as negative controls. The expression of receptors was evaluated using a FACSCanto II flow cytometer (BD, USA).

The obtained data were analyzed using the Graph-Pad Prism 8 software, descriptive statistics methods and nonparametric Wilcoxon test. The differences were recognized as significant at $p < 0.01$.

Results and discussion

It was found that pNK cells cultured in the presence of trophoblast cells of the JEG-3 cell line were characterized by a lower intensity of CD56 receptor expression compared to pNK cells cultured without trophoblast cells. These changes were detected both under culturing in IL-2⁺/IL-15⁺ medium (Figure 1A) and under culturing in IL-2⁺/IL-18⁺ medium (Figure 2A). A reduced number of NKG2C⁺ pNK cells was detected in the presence of trophoblast cells of the JEG-3 cell line compared to NK cells cultured without trophoblast cells in IL-2⁺/IL-15⁺ medium

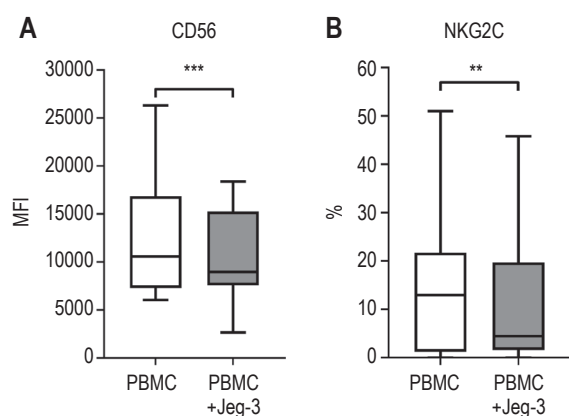


Figure 1. Receptors of pNK cells after culturing in IL-2⁺/IL-15⁺ medium without and with trophoblast cells of the JEG-3 cell line

Note. (A) Intensity of CD56 expression. (B) Number of NKG2C⁺ NK cells. The significance of the differences: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

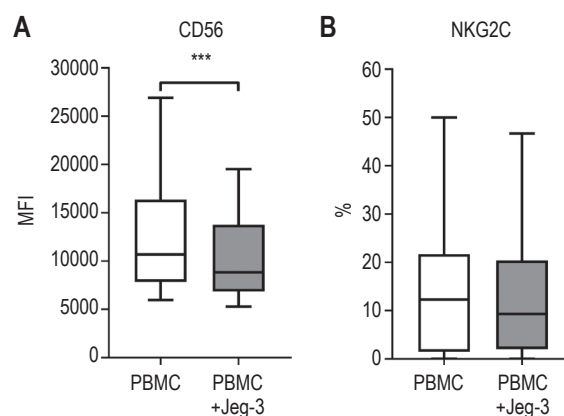


Figure 2. Receptors of pNK cells after culturing in IL-2⁺/IL-18⁺ medium without and with trophoblast cells of the JEG-3 cell line

Note. (A) Intensity of CD56 expression. (B) Number of NKG2C⁺ NK cells. The significance of the differences: ***, $p < 0.001$.

(Figure 1B). The number of NKG2C⁺ pNK cells did not change in the presence of JEG-3 cells when cultured in IL-2⁺/IL-18⁺ medium (Figure 2B).

There were no differences in the expression of KIR3DL1, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DS4, Nkp44, CD215, CD122, CD127, NKG2D receptors under culturing with and without JEG-3 cells in IL-2⁺/IL-15⁺ и IL-2⁺/IL-18⁺ media.

We have previously shown that culturing of NK-92 cells with trophoblast cells of the JEG-3 cell line and IL-2 stimulated the expression of CD56 and NKG2C receptors [10]. Within the system using NK-92 cells, the addition of IL-15 or IL-18 to the culture medium did not change the effect of trophoblast cells of the JEG-3 cell line on CD56 expression by NK cells [10]. While working with pNK cells, we detected an opposite change in the expression of these receptors, compared to that in the system using NK-92 cells. These differences are apparently related to the presence of not only pNK cells, but also monocytes and other lymphocytes in the composition of the mononuclear fraction in our model system.

The number of both NK cells and macrophages increases in the endometrium during the secretory phase of the cycle [5]. In the first trimester of pregnancy, M1 macrophages present in the decidua participate in the regulation of trophoblast cell invasion on an equal basis with NK cells [5]. Decidual macrophages of the first trimester of pregnancy secrete IL-12 [5]. In addition, macrophages expressing the β chain of IL-15 receptor (CD122) were described, which are also present in the decidua [4]. Under the influence of IL-15, CD122⁺ macrophages produce TNF α and IL-6 [4]. Thus, as a result of the addition of IL-15 to mononuclear cells and their culturing in the

presence of trophoblast cells, monocytes can acquire a specific secretory profile. In turn, monocyte activity modified by cytokines can stimulate changes in NK cell phenotype, in particular, it can cause a decrease in CD56 expression and in the number of NKG2C⁺ NK cells in the presence of trophoblast cells.

The literature describes the ability of NK cells to form NK cells similar to memory cells (adaptive (a)NK cells) as a result of culturing with IL-15, IL-12 and subsequent stimulation by target cells of the K562 cell line [12]. Since peripheral blood monocytes can produce IL-12 without prior stimulation [1], it is possible for pNK cells to partially acquire adaptive characteristics. However, CD57⁺NKG2C⁺ phenotype has been assigned specifically for aNK cells, while CD57⁺CD56dim NKG2C⁺ NK cells are possible precursors of aNK cells [6]. Earlier, using a similar model of mononuclear cell culturing in the presence of trophoblast cells of the JEG-3 cell line, we showed an increase in the number of CD16⁺CD57bright pNK cells compared to their number before culturing [11]. At the same time, in this research, we detected a reduced number of NKG2C⁺ NK cells when cultured in IL-2⁺/IL-15⁺ medium in the presence of trophoblast cells. Thus, the changes detected by us in the phenotype of pNK cells in the presence of trophoblast cells of the JEG-3 cell line and IL-15 lines do not allow us to draw a clear conclusion about aNK cell differentiation. Further studies of the effect of cytokines and trophoblast cells on pNK cells are required.

When using IL-2⁺/IL-18⁺ medium, we detected a decrease in the expression of CD56 by pNK cells, while the number of NKG2C⁺ pNK cells did not

change. According to the literature, peripheral blood monocytes do not produce IL-15 in the absence of stimulation [1]. IL-18 does not cause the production of IL-15 and IL-12 by peripheral blood monocytes, but it stimulates the expression of TLR4 and secretion of TNF α and IL-10 by them [2]. This profile of cytokine secretion does not allow us to unambiguously attribute these monocytes to M1 or M2 type. In the absence of IL-15, monocytes do not apparently acquire the characteristics typical of decidual macrophages (M1 or CD122⁺). Therefore, the detected decrease in the expression of CD56 by NK cells in the presence of IL-18 can be attributed

to the influence of monocytes activated by IL-18, but not to the in vitro interaction between NK cells and uterine monocytes/macrophages.

Conclusion

The research detected a decrease in the intensity of CD56 expression by pNK cells as a result of simultaneous effect of IL-15/IL-18 and trophoblast cells on pNK cells in the mononuclear fraction. The established change may be associated with the presence of monocytes in the model system and their indirect effect on pNK cells.

References

1. Carrada G., Caneda C., Salaiza N., Delgado J., Ruiz A., Sanchez B., Gutierrez-Kobeh L., Aguirre M., Becker I. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol.*, 2007, Vol. 29, no 3, pp. 117-226.
2. Dias-Melicio L.A., Fernandes R.K., Rodrigues D.R., Golim M.A., Soares A.M. Interleukin-18 increases TLR4 and mannose receptor expression and modulates cytokine production in human monocytes. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 236839. doi: 10.1155/2015/236839.
3. el-Darawish Y., Li W., Yamanishi K., Pencheva M., Oka N., Yamanishi H., Matsuyama T., Tanaka Y., Minato N., Okamura H. Frontline science: IL-18 primes murine NK cells for proliferation by promoting protein synthesis, survival, and autophagy. *J. Leukoc. Biol.*, 2018, Vol. 104, no. 2, pp. 253-264.
4. Gordon S.M., Nishiguchi M.A., Chase J.M., Mani S., Mainigi M.A., Behrens E.M. IFNs Drive development of novel IL-15-responsive macrophages. *J. Immunol.*, 2020, Vol. 205, no. 4, pp. 1113-1124.
5. Jena M.K., Nayak N., Chen K., Nayak N.R. Role of macrophages in pregnancy and related complications. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2019, Vol. 67, no. 5, pp. 295-309.
6. Kobzyeva P.A., Streltsova M.A., Erokhina S.A., Kanevskiy L.M., Telford W.G., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I. CD56(dim) CD57(-) NKG2C(+) NK cells retaining proliferative potential are possible precursors of CD57(+) NKG2C(+) memory-like NK cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2020, Vol. 108, no. 4, pp. 1379-1395.
7. Koka R., Burkett P.R., Chien M., Chai S., Chan F., Lodolce J.P., Boone D.L., Ma A. Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 197, no. 8, pp. 977-984.
8. Li J., Li Y., Zhou X., Wei L., Zhang J., Zhu S., Zhang H., Gao X., Sharifu L.M., Wang S., Xi L., Feng L. Upregulation of IL-15 in the placenta alters trophoblasts behavior contributing to gestational diabetes mellitus. *Cell Biosci.*, 2021, Vol. 11, no. 1, 33. doi: 10.1186/s13578-021-00533-4.
9. Liu M., Meng Y., Zhang L., Han Z., Feng X. High-efficient generation of natural killer cells from peripheral blood with preferable cell vitality and enhanced cytotoxicity by combination of IL-2, IL-15 and IL-18. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2021, Vol. 534, pp. 149-156.
10. Mikhailova V., Khokhlova E., Grebenkina P., Salloum Z., Nikolaenkov I., Markova K., Davidova A., Selkov S., Sokolov D. NK-92 cells change their phenotype and function when cocultured with IL-15, IL-18 and trophoblast cells. *Immunobiology*, 2021, Vol. 226, no. 5, 152125. doi: 10.1016/j.imbio.2021.152125.
11. Mikhailova V.A., Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K., Milyutina Y.P., Demidova E.S., Panina A.N., Bazhenov D.O., Belikova M.E., Selkov S.A., Sokolov D.I. Trophoblast cell influence on peripheral blood natural killer cell proliferation and phenotype in non-pregnant women and women in early pregnancy. *Immunobiology*, 2020, Vol. 225, no. 3, 151910. doi: 10.1016/j.imbio.2020.151910.
12. Romee R., Schneider S.E., Leong J.W., Chase J.M., Keppel C.R., Sullivan R.P., Cooper M.A., Fehniger T.A. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood*, 2012, Vol. 120, no. 24, pp. 4751-4760.
13. Tokmadzic V.S., Tsuji Y., Bogovic T., Laskarin G., Cupurdija K., Strbo N., Koyama K., Okamura H., Podack E.R., Rukavina D. IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2002, Vol. 48, no. 4, pp. 191-200.

14. Tornroos H., Hagerstrand H., Lindqvist C. Culturing the human natural killer cell line NK-92 in Interleukin-2 and Interleukin-15 - implications for clinical trials. *Anticancer Res.*, 2019, Vol. 39, no. 1, pp. 107-112.
15. Wu Y., Tian Z., Wei H. Developmental and functional control of natural killer cells by cytokines. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 930. doi: 10.3389/fimmu.2017.00930.

Авторы:

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

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

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

Давыдова А.А. — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Загайнова В.А. — аспирант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Коган И.Ю. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

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

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

Authors:

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

Grebenkina P.V., Laboratory Assistant, Laboratory of Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Tyshchuk E.V., Laboratory Assistant, Laboratory of Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Davydova A.A., Junior Research Associate, Laboratory of Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Zagaynova V.A., Postgraduate Student, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Kogan I.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

ЛОКАЛЬНЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАРОДОНТИТЕ

Мудров В.П.¹, Давыдова Н.В.², Мишина Т.Е.², Казаков С.П.^{1,2}

¹ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»

Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны РФ, Москва, Россия

Резюме. Микрофлора ротовой полости формирует биопленку, индуцирующую хроническое воспаление, при котором последствия инфекции играют решающую роль в патогенезе пародонтита. При заболеваниях пародонта выявляются Th1, Th2, Th17, Treg. Имеются данные о том, что Т-регуляторные клетки (Treg) являются ключевыми противовоспалительными клетками. Th17-клетки и Treg-клетки играют важную роль в дифференцировке остеокластов. Секретируемый клетками Th17 IL-17 влияет на остеокластогенез и может индуцировать макрофаги к усилению местного воспалительного ответа. В связи с этим, целью работы стало определение клеток местной иммунной системы ротовой полости, связанных со степенью тяжести хронического генерализованного пародонтита. Обследована ротовая полость 58 человек в возрасте 38-65 лет обоего пола зрелого возраста с диагнозом «хронический пародонтит» методом проточной цитофлуориметрии. Исследование уровня нейтрофилов CD64⁺CD16⁺CD14⁻ при различных степенях тяжести пародонтита выявило статистически значимое увеличение количества клеток при развитии заболевания. При легкой степени тяжести ХГП выявилось существенное повышение уровня CD64⁺CD16⁺CD14⁻ Me = 36,16% (p < 0,05) по сравнению с контрольной группой (Me = 7,7%; Q_{0,25} = 2,4%; Q_{0,75} = 12%). Исследование относительного количества моноцитов CD14⁺ при различных степенях тяжести пародонтита выявило статистически значимое снижение количества клеток тяжелой степени пародонтита. Исследование уровня регуляторных Т-лимфоцитов CD4⁺CD25⁺CD127^{low} при различных степенях тяжести пародонтита выявило статистически значимое снижение количества клеток при развитии заболевания: при легкой степени тяжести ХГП (Me = 5,6%; Q_{0,25} = 1,8%; Q_{0,75} = 8%) по сравнению с контрольной группой (Me = 22,7%; Q_{0,25} = 12%; Q_{0,75} = 32%). Полученные результаты подтверждают противовоспалительную регулирующую функцию Treg. Понимание остеоиммунных механизмов контроля ремоделирования костной ткани позволит понять патофизиологию ускоренной потери костной массы, наблюдаемой при хроническом пародонтите тяжелой степени.

Ключевые слова: пародонтит, Treg-клетки, нейтрофилы, моноциты

LOCAL CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN CHRONIC PERIODONTITIS

Mudrov V.P.^a, Davidova N.V.^b, Mishina T.E.^b, Kazakov S.P.^{a, b}

^a Russian Medical Academy for Postgraduate Medical Education, Moscow, Russian Federation

^b N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Abstract. Microflora of the oral cavity forms a biofilm that induces response of immune system at the mucous membranes. Transition to periodontal lesion is provided by certain classes of resident mucosal immune cells

Адрес для переписки:

Мудров Валерий Павлович
ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия
непрерывного профессионального образования»
Министерства здравоохранения РФ
125284, Россия, Москва, ул. Поликарпова, 10.
Тел.: 8 (916) 174-44-77.
E-mail: vpmudrov@yandex.ru

Address for correspondence:

Mudrov Valery P.
Russian Medical Academy for Postgraduate Medical Education
125284, Russian Federation, Moscow, Polikarpov str., 10.
Phone: 7 (916) 174-44-77.
E-mail: vpmudrov@yandex.ru

Образец цитирования:

В.П. Мудров, Н.В. Давыдова, Т.Е. Мишина,
С.П. Казаков «Локальный клеточный иммунный ответ
при хроническом пародонтите» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1389-1394.
doi: 10.15789/1563-0625-LCI-2377
© Мудров В.П. и соавт., 2021

For citation:

V.P. Mudrov, N.V. Davidova, T.E. Mishina, S.P. Kazakov
“Local cellular immune response in chronic periodontitis”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1389-1394.
doi: 10.15789/1563-0625-LCI-2377
DOI: 10.15789/1563-0625-LCI-2377

and inflammatory/immune cells migrating to the periodont. In periodontal diseases, Th1, Th2, Th17, Treg are detected. T regulatory cells (Tregs) are proven to comprise the main anti-inflammatory cell population. Th17 cells and Treg cells play an important role in osteoclast differentiation. IL-17 secreted by Th17 cells affects osteoclastogenesis and may induce macrophages to enhance the local inflammatory response. In this regard, the aim of our work was to identify the local immune cells in oral cavity which are associated with severity of chronic generalized periodontitis. The oral cavity cells from 58 persons aged 38–65 years of both sexes in their mature age with a diagnosis of «chronic periodontitis» were examined by means of flow cytofluorometry. When determining levels of CD64⁺CD16⁺CD14⁺ neutrophils in the patients with periodontitis of different severity, a statistically significant increase of this cell population was revealed upon development of this disease. In mild cases of periodontitis, a significant increase of relative CD64⁺CD16⁺CD14⁺ neutrophil contents was revealed (Me = 36.16%, $p < 0.05$) compared to the control group (Me = 7.7%, $Q_{0.25} = 2.4\%$, $Q_{0.75} = 12\%$). When assessing relative numbers of CD14⁺ monocytes in periodontitis of various severity, we revealed a significant increase in the number of these cells in severe cases. When studying levels of regulatory T lymphocytes (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) in periodontitis of different severity, we revealed significantly decreased amounts of this cell population during development of the disease. In mild cases of periodontitis, a decreased level of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} cells ($p < 0.05$, Me = 1356 cells/ml) was revealed, as compared with control group (Me = 10666 cells/ml). Although the concentration of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (Me = 4709 cells/ml) in the patients with moderate periodontitis was higher than the values in milder cases, the range of the main values was comparable and lower, than in control group. In severe periodontitis, a significantly decreased concentration of regulatory T lymphocytes was revealed (Me = 2637 cells/ml). These results confirm the anti-inflammatory regulatory function of Tregs. Understanding the osteo-immune mechanisms of bone remodeling control will help to understand the pathophysiology of accelerated bone loss observed in severe chronic periodontitis.

Keywords: periodontitis, Treg cells, neutrophils, monocytes

Введение

Микрофлора ротовой полости формирует биопленку, вызывающую хроническое воспаление, при котором инфекция и ее последствия играют решающую роль в патогенезе пародонтита. Микрофлора не только участвует в регуляции различных физиологических функций в организме человека, но и связана со многими заболеваниями человека. Бактериальная биопленка пародонта индуцирует воспалительный инфильтрат в ткани пародонта, в котором доминирующие популяции иммунных клеток могут отличаться от человека к человеку.

При заболеваниях пародонта можно наблюдать несколько подгрупп Т-клеток: Th1, Th2, Th17, Treg и другие. Это подтверждается остеоиммунным профилем популяций лимфоцитов, связанных с остеокластогенезом. Th1 и Th17 связаны с разрушением костей, в то время как Th2 и Treg оказывают подавляющее влияние на воспалительный остеолит [7].

Пародонтит характеризуется периодами обострения, чередующимися с периодами ремиссии. Имеются данные о том, что Т-регуляторные клетки (Treg) являются ключевыми противовоспалительными клетками, поэтому их можно определить как группу Т-клеточной популяции, функционально подавляющую иммунный ответ, через влияние на активность других типов клеток [2]. Th17-клетки и Treg-клетки играют

важную роль в дифференцировке остеокластов. Макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) и активатор рецепторов ядерного фактора-лиганд κB (RANKL) действуют как мост между иммунной системой и костной системой. Th17 экспрессируют высокие поверхностные уровни RANKL, который связываясь с RANK на поверхности клеток-предшественников остеокластов, способствует дифференцировке клеток-предшественников в остеокласты для ускорения поглощения костной ткани. С другой стороны, секретируемый клетками Th17 IL-17 непосредственно усиливает экспрессию RANKL в клетках, поддерживающих остеокластогенез, таких как остеобласты и синовиальные фибробласты. Кроме того, IL-17 также может индуцировать макрофаги к продукции различных воспалительных факторов: TNF α , IL-1, IL-6 для активации и усиления местного воспалительного ответа, что косвенно способствует экспрессии RANKL в клетках, поддерживающих остеокластогенез, усиливает связывание RANKL с RANK на поверхности клеток-предшественников остеокластов и синергически ускоряет поглощение костной ткани остеокластами [8].

Наблюдается увеличение активированных цитотоксических Т-клеток как у пациентов с ОГП, так и у пациентов с ХГП. Неконтролируемая активация цитотоксических клеток приводит к повреждению тканей. Уровень активированных

цитотоксических Т-клеток контролируется регуляторными Т-клетками (Treg).

Цель работы — определить клетки местной иммунной системы ротовой полости, связанные со степенью тяжести хронического генерализованного пародонтита.

Материалы и методы

Обследовано 58 человек в возрасте 38–65 лет, разделенных на четыре группы. При формировании групп руководствовались критериями включения пациентов обоего пола зрелого возраста с диагнозом «хронический пародонтит» (K05.3 по МКБ-10). В 1 группу вошли пациенты ($n = 12$) с легкой степенью тяжести пародонтита. Во 2 группу были включены пациенты ($n = 16$) со средней степенью тяжести пародонтита. В 3 группу вошли пациенты ($n = 15$) с тяжелой степенью тяжести пародонтита. Группа контроля — 4 была сформирована из 15 человек в возрасте 30–42 лет с удовлетворительным уровнем гигиены рта, отсутствием заболеваний пародонта, очень низким уровнем интенсивности кариеса зубов.

Исследование проводили на базе лабораторного отделения ГВКГ им. акад. Н.Н. Бурденко Министерства обороны РФ в 2020–2021 гг. Клиническое обследование пациентов включало сбор жалоб, анамнеза, стандартный стоматологический осмотр согласно клиническим рекомендациям.

При обследовании пациентов уточняли жалобы, их характер и продолжительность. Фиксировали наличие и проявление аллергических реакций, соматических сопутствующих заболеваний. После разъяснения и полного понимания пациентом всех этапов сотрудничества им подписывалась форма информированного согласия на участие в исследовании.

Состояние местной клеточной иммунной системы ротовой полости оценивалось по следующим параметрам:

- Нейтрофилы, $CD64^+CD16^+CD14^-$;
- Моноциты, $CD14^+CD14^+HLA-DR^+$;
- NK-клетки, $CD3^+CD16^+CD56^+$;
- Т-лимфоциты: $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, Такт. $CD3^+HLA-DR^+$, Treg $CD4^+CD25^+CD127^{Low}$, Т-NK $CD3^+CD16^+CD56^+$;

- В-лимфоциты: $CD19^+$, $CD19^+HLA-DR^+$, B1 $CD19^+5^+B27^-$, B2 $CD19^+5^+B27^-$, Впам $CD19^+CD5^+B27^+$.

Для анализа концентрации, размера и жизнеспособности клеток в образце проводили подсчет клеток на автоматическом счетчике клеток TC20 (ООО «БИО-РАД Лаборатории», США). Проточную цитометрию проводили на приборе Cytomics FC 500 (ООО «Бекмен Культер», США) моноклональными антителами (ООО «Бекмен Культер», США).

Пациенты проводили полоскание ротовой полости натошак, без утренней чистки зубов, 50 мл стерильного 0,9% NaCl. 10 мл образца отбирали в центрифужную пробирку, центрифугировали 10 мин на 1500 об/мин. Отбирали надосадочную жидкость. Осадок разводили в 500 мкл фосфатно-солевого буфера. К 30 мкл осадка добавляли 3 мкл моноклональных антител. Инкубировали 90 мин при 28 °С, снимали результат.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA (StatSoft, США) версия 12.0 с расчетом средних арифметических величин с ее предельными отклонениями и среднеквадратичной ошибки. Соответствие данных нормальному распределению проверяли по критерию Колмогорова–Смирнова. При отсутствии нормального распределения данных использовали непараметрические критерии. В качестве критерия достоверности использовали статистический критерий Манна–Уитни для двух несвязанных групп и Краскела–Уоллиса ANOVA для трех и более несвязанных групп. При анализе взаимосвязей внутри пары количественных или порядковых качественных признаков использовали корреляционный анализ по методу Спирмена. Достоверными принимались значения при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование уровня нейтрофилов $CD64^+CD16^+CD14^-$ при различных степенях тяжести пародонтита выявило статистически значимое увеличение количества клеток при развитии заболевания. При легкой степени тяжести ХГП выявилось существенное повышение уровня $CD64^+16^+14^-$ $Me = 36,16\%$ ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой ($Me = 7,7\%$; $Q_{0,25} = 2,4\%$; $Q_{0,75} = 12\%$). При средней и тяжелой степени пародонтита концентрация $CD64^+CD16^+CD14^-$ несколько снижалась относительно легкой степени тяжести, диапазон основных значений был сопоставим и выше чем в контрольной группе.

Исследование относительного количества моноцитов $CD14^+$ при различных степенях тяжести пародонтита выявило статистически значимое увеличение количества клеток тяжелой степени пародонтита (рис. 1). При этом, хотя диапазон значений был сопоставим у пациентов контрольной группы ($Me = 243200$ кл/мл) и пациентов с заболеванием, наблюдалась тенденция к снижению моноцитов при легкой ($Me = 10984$ кл/мл) и средней степени тяжести ХГП ($Me = 54600$ кл/мл) и существенное повышение уровня $CD14^+$ ($Me = 118000$ кл/мл; $Q_{0,25} = 68400$ кл/мл; $Q_{0,75} = 180600$ кл/мл, $p < 0,05$) при тяжелой степени по сравнению с контрольной группой.

Исследование количества лимфоцитов при различных степенях тяжести пародонтита выявило существенное снижение по сравнению с контрольной группой. Эта тенденция к снижению была при легкой ($Me = 83332$ кл/мл), средней степени тяжести ХГП ($Me = 71631$ кл/мл) и тяжелой $CD3^+$ ($p < 0,05$) ($Me = 47600$ кл/мл; $Q_{0,25} = 30600$ кл/мл; $Q_{0,75} = 171500$ кл/мл). При этом относительный уровень лимфоцитов был ниже, чем у здоровых лиц ($Me = 41,95\%$; $Q_{0,25} = 37\%$; $Q_{0,75} = 44\%$), независимо от степени тяжести заболевания.

Исследование уровня лимфоцитов $CD4^+$ при различных степенях тяжести пародонтита не выявило статистически значимых различий. Диапазон основных значений был $0,2-1,7\%$. Исследование уровня лимфоцитов $CD8^+$ при различных степенях тяжести пародонтита также не выявило статистически значимых различий. Диапазон основных значений был $0,1-1,6\%$. Хотя при средней и тяжелой степени тяжести ХГП был выявлен больший разброс значений.

Исследование уровня регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ при различных степенях тяжести пародонтита выявило статистически значимое снижение количества клеток при развитии заболевания (рис. 2). При легкой степени тяжести ХГП выявилось снижение уровня $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ ($p < 0,05$) ($Me = 1356$ кл/мл) по сравнению с контрольной

группой ($Me = 10666$ кл/мл). Хотя при средней степени пародонтита концентрация $CD4^+25^+127^{low}$ ($Me = 4709$ кл/мл) повысилась относительно легкой степени тяжести, диапазон основных значений был сопоставим и ниже чем в контрольной группе. При тяжелой степени пародонтита происходило существенное снижение концентрации регуляторных Т-лимфоцитов ($Me = 2637$ кл/мл).

Тяжесть и степень пародонтита зависят от взаимодействия между запускающими микробными факторами и иммунной системой хозяина. В этом процессе, гетерогенные по своей природе и функциям, моноциты и макрофаги играют важную роль. Наши анализы выявили высокое содержание моноцитов $CD14^+$ у пациентов с пародонтитом и более высокую экспрессию у этих клеток HLA-DR, повышенная экспрессия которого, связана с более высокой продукцией IL-1 β и IFN γ при стимуляции Toll-подобных рецепторов. Эти данные указывают на то, что управление балансом макрофагов может быть вариантом терапии пародонтита. Поскольку макрофаги играют ключевую роль в патогенезе пародонтита при диабете, функция макрофагов и модуляция фенотипа могут быть разумной терапевтической мишенью для лечения воспаления пародонта и связанной с ним резорбции костной ткани у пострадавших лиц. В одном из исследований описан повышенный процент $CD14^+CD16^+$ моноцитов

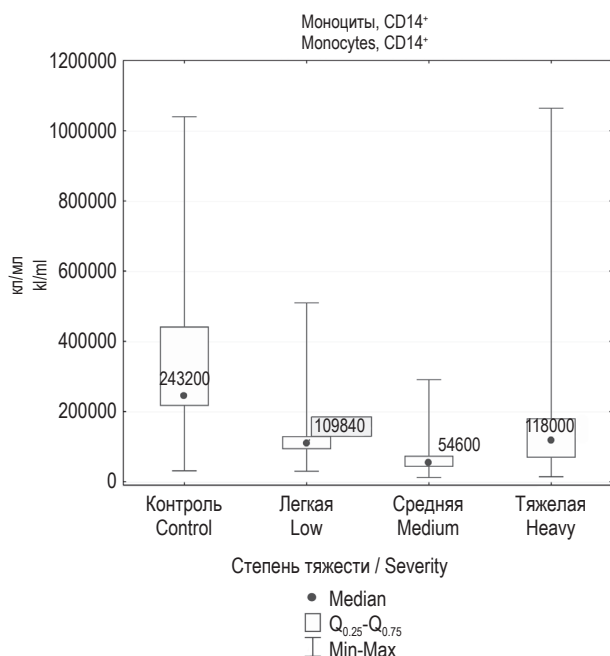


Рисунок 1. Уровень моноцитов $CD14^+$ у пациентов с ХГП различной степени тяжести

Figure 1. Number of $CD14^+$ monocytes in patients with chronic periodontitis of varying severity

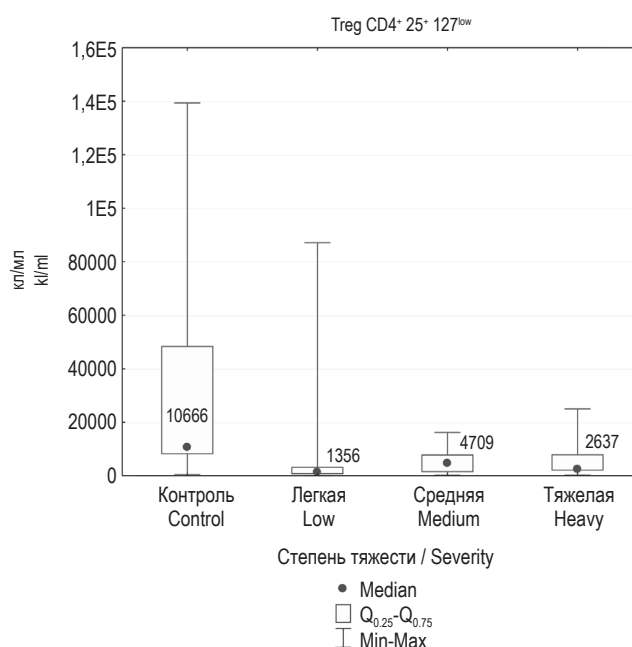


Рисунок 2. Уровень регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ у пациентов с ХГП различной степени тяжести

Figure 2. Number of regulatory T lymphocytes $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ in patients with chronic periodontitis of varying severity

в периферической крови пациентов с хроническим пародонтитом по сравнению со здоровыми лицами [8].

Роль макрофагов памяти в тканях пародонта изучена недостаточно. Распределение и роль этих макрофагов, механизмы рекрутирования промежуточных моноцитов в воспалительную нишу и их способность дифференцироваться в макрофаги все еще неясны в контексте пародонтита и нуждаются в изучении в будущих исследованиях. В частности, в будущих исследованиях следует оценить функциональный анализ фагоцитоза и точное перепрограммирование макрофагов в ответ на окружающую среду и бактериальный вызов в десневой среде. Но в целом данные о популяциях моноцитов периферической крови при пародонтите скудны [14].

Полученные результаты подтверждают противовоспалительную регулируемую функцию Treg. Функция этих клеток была описана в *Porphyromonas gingivalis*-индуцированном пародонтите у мышей, где подавление Treg было связано с прогрессированием заболевания, а индукция Treg была связана со снижением иммунновоспалительного ответа. Различные терапевтические стратегии, включающие Treg, потенциально могут подавлять иммунновоспалительную реакцию и восстанавливать гомеостаз альвеолярной кости во время пародонтита [10, 13]. Тем не менее, существенная методологическая вариабельность в получении результатов предполагают осторожность при оценке результатов этих исследований [3]. Исследования показывают, что Treg играют защитную роль против

резорбции костной ткани при заболеваниях пародонта, вероятно, за счет снижения экспрессии RANKL, опосредованной клетками Th1 и Th17 при пародонтите [6]. Влияние баланса между Th17-клетками и Treg-клетками на костную массу очевидно. Если баланс Th17/Treg-клеток смещается в сторону Th17-клеток, резорбция костной ткани усиливается и риск остеопороза значительно увеличивается [11].

Заключение

В настоящее время лечение остеопороза в основном включает замещение эстрогенов, лечение фосфатами, кальцием и витамином D. Углубленное изучение факторов, влияющих на баланс Th17/Treg клеток при остеопорозе, поможет в дальнейшем определить цели для новых препаратов для лечения остеопороза, которые также имеют решающее значение для поддержания здоровья человека. Однако имеющиеся данные о клетках продуцирующих IFN γ , IL-4, IL-17 не являются окончательными.

Направление иммунологии — остеоиммунология, указывает на связь между клетками иммунной системы и гомеостазом костной ткани. Понимание механизмов, контролирующих процессы ремоделирования костной ткани прояснит не только события, участвующие в регуляции гомеостаза костной ткани, но и патофизиологию ускоренной потери костной массы, наблюдаемой при хроническом пародонтите тяжелой степени и при других заболеваниях, таких как остеопороз и ревматоидный артрит.

Список литературы / References

1. Almubarak A., Kiran K., Tanagala K., Papapanou P.N., Lalla E., Momen-Heravi F. Disruption of monocyte and macrophage homeostasis in periodontitis. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 330. doi: 10.3389/fimmu.2020.00330.
2. Arul D., Rao S. Isolation of naturally Induced T-regulatory cells in gingival tissues of healthy human subjects and subjects with gingivitis and chronic periodontitis. *Cureus*, 2019, Vol. 11, no. 3, e4283. doi: 10.7759/cureus.4283
3. Cafferata E.A., Jerez A., Vernal R., Monasterio G., Pandis N., Faggion C.M. The therapeutic potential of regulatory T lymphocytes in periodontitis: A systematic review. *J. Periodontal Res.*, 2019, Vol. 54, Iss. 3, pp. 207-217.
4. Chen X.T., Chen L.L., Tan J.Y., Shi D.H., Ke T., Lei L.H. Th17 and Th1 lymphocytes are correlated with chronic periodontitis. *Immunol. Invest.*, 2016, Vol. 45, pp. 243-254.
5. Cheng W.-C., Saleh F., Abuaisha Karim B., Hughes F.J., Taams L.S. Comparative analysis of immune cell subsets in peripheral blood from patients with periodontal disease and healthy controls. *Clin. Exp. Immunol.*, 2018, Vol. 194, no. 3, pp. 380-390.
6. Cifcibasi E., Ciblak M., Kiran B., Badur S., Firatli E., Issever H., Cintan S. The role of activated cytotoxic T Cells in etiopathogenesis of periodontal disease: does it harm or does it heal? *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 9262. doi: 10.1038/srep09262.
7. da Motta R.J.G., L.Y. Almeida, Villafuerte K.R.V., Ribeiro-Silva A., León J.E., Tirapelli C. FOXP3⁺ and CD25⁺ cells are reduced in patients with stage IV, grade C periodontitis: A comparative clinical study. *J. Periodontal Res.*, 2020, Vol. 55, Iss. 3, pp. 374-380.
8. Jagannathan R., Lavu V., Rao S.R. Comparison of the proportion of non-classic (CD14⁺CD16⁺) monocytes/macrophages in peripheral blood and gingiva of healthy individuals and patients with chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, 2014, Vol. 85, pp. 852-858.
9. Medara N., Lenzo J.C., Walsh K.A., O'Brien-Simpson N.M., Reynolds E.C., Darby I.B. Peripheral T helper cell profiles during management of periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 2021, Vol. 48, pp. 77-91.

10. Nagai K., Ideguchi H., Kajikawa T., Li X., Chavakis T., Cheng J., Messersmith P.B., Heber-Katz E., Hajishengallis G. An injectable hydrogel-formulated inhibitor of prolyl-4hydroxylase promotes T regulatory cell recruitment and enhances alveolar bone regeneration during resolution of experimental periodontitis. *FASEB J.*, 2020, Vol. 34, no. 10, pp. 13726-13740.
11. Rojas C., Campos-Mora M., Cárcamo I., Villalón N., Elhusseiny A., Contreras-Kallens P., Refisch A., Gálvez-Jirón F., Emparán I., Montoya-Riveros A., Vernal R., Pino-Lagos K. T regulatory cells-derived extracellular vesicles and their contribution to the generation of immune tolerance. *J. Leukoc. Biol.*, 2020, Vol. 108, no. 3, pp. 813-824.
12. Schmidt J., Jentsch H., Stingu C.S., Sack U. General immune status and oral microbiology in patients with different forms of periodontitis and healthy control subjects. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, e109187. doi: 10.1371/journal.pone.0109187.
13. Wei L., Xu M., Xiong H. An update of knowledge on the regulatory role of Treg cells in apical periodontitis. *Oral Dis.*, 2021, Vol. 27, no. 6, pp. 1356-1365.
14. Zhu L., Hua F., Ding W., Ding K., Zhang Y., Xu C. The correlation between the Th17/Treg cell balance and bone health. *Immun. Ageing.*, 2020, Vol. 17, 30. doi: 10.1186/s12979-020-00202-z.

Авторы:

Мудров В.П. — к.м.н., ассистент кафедры медицинской биохимии и иммунопатологии Академического образовательного центра фундаментальной и трансляционной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ; врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ «Диагностический клинический центр № 1 Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Давыдова Н.В. — врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны РФ, Москва, Россия

Мишина Т.Е. — врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны РФ, Москва, Россия

Казаков С.П. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой медицинской биохимии и иммунопатологии Академического образовательного центра фундаментальной и трансляционной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ; начальник центра клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны РФ, Москва, Россия

Authors:

Mudrov V.P., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Medical Biochemistry and Immunopathology, Academic Center of Fundamental and Translational Medicine, Russian Medical Academy for Postgraduate Medical Education; Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Diagnostic Clinical Center No. 1, Moscow City Health Department, Moscow, Russian Federation

Davidova N.V., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Mishina T.E., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Kazakov S.P., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Medical Biochemistry and Immunopathology, Academic Centre for Translational and Fundamental Medicine, Russian Medical Academy for Postgraduate Medical Education; Head, Centre of Clinical Laboratory Diagnostics, N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

ОЦЕНКА СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ НА АНТИТЕЛА К РАЗЛИЧНЫМ АНТИГЕНАМ ВИРУСА SARS-CoV-2. СОПОСТАВЛЕНИЕ ШЕСТИ ТЕСТ-СИСТЕМ

Белякова В.В.¹, Майорова О.А.¹, Иванова Н.В.¹, Степанова И.Е.¹,
Смердова М.А.², Обрядина А.П.³, Топтыгина А.П.^{4,5}

¹ ГБУЗ «Центр крови имени О.К. Гаврилова Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

² ЗАО «Вектор-Бест-Европа», Москва, Россия

³ ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы», г. Нижний Новгород, Россия

⁴ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Резюме. Новый коронавирус SARS-CoV-2 явился глобальным вызовом медицине и, в частности, лабораторной диагностике. Исследование уровня антител к SARS-CoV-2 можно использовать как подтверждающий тест при диагностике заболевания, но оно приобретает первостепенное значение при оценке популяционного иммунитета, возникшего в результате заболевания или вакцинации, а также при выборе доноров плазмы реконвалесцентов. Разработанные в нашей стране и зарубежом тест-системы для выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 различаются как по способам проведения тестирования, так и по использованным антигенам коронавируса, к которым направлены антитела. Целью настоящего исследования было сравнение диагностической чувствительности и специфичности пяти тест-систем для обнаружения антител класса IgG к вирусу SARS-CoV-2, основанных на разных методах диагностики. Исследованы образцы сыворотки крови от 137 реконвалесцентов COVID-19 и 166 доноров крови и ее компонентов. Контрольную группу составили 50 сывороток крови, собранные в начале 2019 года, и 19 сывороток, собранные в 2018 году (до появления вируса SARS-CoV-2) и хранившиеся при -70 °С. Тестирование проводили в аналитических системах: экспресс-тест COVID-19 IgM/IgG Rapid Test (Colloidal Gold) (КНП), на автоматическом иммунохимическом анализаторе Abbott Architect™ i2000 и реагентах SARS-CoV-2-IgG (Abbot, Chicago, IL США), методом хемилюминисценции с использованием автоматического анализатора серии CL и реагентов фирмы Mindray (КНП) SARS-CoV-2 IgM и SARS-CoV-2 IgG и иммуноферментным методом на наборах компаний ООО «Диагностические системы» (г. Нижний Новгород) ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G, ООО «Хема» (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России) SARS-CoV-2-IgG-ИФА и ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ и SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ. При сопоставлении результатов тестирования 137 образцов плазмы на тест-системах «Вектор-Бест» и Mindray для IgG-антител 127 образцов были положительными, 7 образцов – отрицательными на обеих тест-системах, несовпадение – 2,2%. При исследовании IgM-антител 32,1% были положитель-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

В.В. Белякова, О.А. Майорова, Н.В. Иванова, И.Е. Степанова, М.А. Смердова, А.П. Обрядина, А.П. Топтыгина «Оценка серологических тестов на антитела к различным антигенам вируса SARS-CoV-2. Сопоставление шести тест-систем» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1395-1404.
doi: 10.15789/1563-0625-AOS-2228
© Белякова В.В. и соавт., 2021

For citation:

V.V. Belyakova, O.A. Maiorova, N.V. Ivanova, I.E. Stepanova, M.A. Smerdova, A.P. Obryadina, A.P. Toptygina "Assessment of serological tests for antibodies to different antigens of the SARS-CoV-2 virus: comparison of six immunoassays", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1395-1404.
doi: 10.15789/1563-0625-AOS-2228
DOI: 10.15789/1563-0625-AOS-2228

ными, а 52,6% — отрицательными в обеих тест-системах. Процент несовпадений составил 15,3%. Из 166 образцов отрицательной в 5 тест-системах оказалась 1 сыворотка (0,6%). На тест-системе Mindray IgG-антитела к антигенам вируса SARS-CoV-2 выявлены в 165 образцах (99,4%), на «Вектор-Бест» — в 164 сыворотках (98,8%), на «Диагностических системах» — в 151 (90,96%), на Хема — в 154 (92,8%), а на Abbott — в 155 образцах (93,4%). При этом 135 (81,33%) образцов были положительными во всех тест-системах, тогда как 30 образцов имели дискордантные результаты (18,07%), а в 9 сыворотках специфических IgG не обнаруживалось в 2 и более тест-системах. ROC-анализ выявил высокую диагностическую ценность всех исследованных тест-систем (AUC от 0,908 до 0,998), что свидетельствует о высоком качестве разделительной модели положительных и отрицательных образцов ($p < 0,001$). При заданных производителями тест-систем cut-off чувствительность и специфичность находилась в диапазоне от 82,8% и 93,3% для набора «Диагностические системы» до 99,4% и 95,8% для набора «Вектор-Бест». Рассчитанные коэффициенты корреляции были выше между тест-системами со сходным составом использованного в тест-системе антигена, поэтому наблюдение за динамикой антител лучше проводить в тест-системах одной и той же фирмы-производителя.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, диагностика COVID-19, антитела, сопоставление тест-систем, S-белок, N-белок

ASSESSMENT OF SEROLOGICAL TESTS FOR ANTIBODIES TO DIFFERENT ANTIGENS OF THE SARS-CoV-2 VIRUS: COMPARISON OF SIX IMMUNOASSAYS

Belyakova V.V.^a, Maiorova O.A.^a, Ivanova N.V.^a, Stepanova I.E.^a,
Smerdova M.A.^b, Obryadina A.P.^c, Toptygina A.P.^{d, e}

^a O. Gavrilov Blood Center, Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

^b Vector-Best-Europe CJSC, Moscow, Russian Federation

^c Research and Production Company Diagnostic Systems, Ltd., Nizhny Novgorod, Russian Federation

^d G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. The new coronavirus SARS-CoV-2 has become a global challenge to medicine and, in particular, laboratory diagnostics. The study of the antibodies' level to SARS-CoV-2 can be used as a confirmation test in the diagnosis of a disease, but it becomes of paramount importance in assessing population immunity resulting from a disease or vaccination, as well as in selection of convalescent plasma donors. The kits developed in our country and abroad for detecting antibodies to the SARS-CoV-2 virus differ both in the methods of testing and in the used coronavirus antigens to which the antibodies are directed. The aim of this study was to compare the diagnostic sensitivity and specificity of five kits for the detection of IgG antibodies to the SARS-CoV-2 virus, based on different diagnostic methods. Serum samples from 137 COVID-19 convalescents and 166 donors of blood and its components were examined. The control group consisted of 50 blood sera collected at the beginning of 2019 and 19 sera collected in 2018 (before the advent of the SARS-CoV-2 virus) and stored at -70 °C. Testing was carried out in analytical systems: rapid test "COVID-19 IgM/IgG Rapid Test (Colloidal Gold)" (China), on an automatic immunochemical analyzer Abbott Architect™ i2000 and kit "SARS-CoV-2-IgG" (Abbot, Chicago, IL USA), by the chemiluminescence method using an automatic analyzer of the CL series and kits of the "Mindray" company (China) "SARS-CoV-2 IgM" and "SARS-CoV-2 IgG" and by the enzyme immunoassay method on the kits of the companies "Diagnostic Systems" Ltd (Russia, Nizhny Novgorod) "DS-IFA-ANTI-SARS-CoV-2-G", "Xema" Ltd (Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Hematology" of the Ministry of Health of Russia) "SARS-CoV-2-IgG-IFA" and "Vector-Best" CJSC (Russia, Novosibirsk) SARS-COV-2-IgM-IFA-BEST" and "SARS-COV-2-IgG-IFA-BEST". When comparing the results of testing 137 plasma samples on the Vector-Best and Mindray kits for IgG antibodies, 127 samples were positive, 7 samples were negative on both kits, the discrepancy was 2.2%. In the study of IgM antibodies, 32.1% were positive, and 52.6% were negative in both kits. The discrepancy rate was 15.3%. Out of 166 samples, 1 serum (0.6%) was negative in 5 kits. On the Mindray kit, IgG antibodies to the antigens of the SARS-CoV-2 virus were detected in 165 samples (99.4%), on Vector-Best — in 164 sera (98.8%), on Diagnostic systems — in 151 (90.96%), on Xema — in 154 (92.8%), and on Abbott — in 155 samples

(93.4%). At the same time, 135 (81.33%) samples were positive in all kits, while 30 samples had discordant results (18.07%), and in 9 sera, specific IgG was not detected in 2 or more kits. ROC analysis revealed a high diagnostic value of all tested kits (AUC from 0.908 to 0.998), which indicates a high quality of the separation model of positive and negative samples ($p < 0.001$). With the cut-off set by the manufacturers, the sensitivity and specificity ranged from 82.8% and 93.3% for the Diagnostic Systems kit to 99.4% and 95.8% for the Vector-Best kit. The calculated correlation coefficients were higher between kits with a similar composition of the antigen used in the kits; therefore, it is better to monitor the dynamics of antibodies by diagnostic kits from the same manufacturer.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19 diagnostics, antibodies, comparison of kits, S-protein, N-protein

Введение

Новый коронавирус SARS-CoV-2 явился глобальным вызовом медицине [25] и, в частности, лабораторной диагностике. Методы, основанные на полимеразной цепной реакции весьма чувствительны и специфичны, но зависимы от качества взятого материала и наличия мутаций [8, 21]. Если вирус находится в легких, его можно и не обнаружить в мазках из носоглотки [24]. С другой стороны, методы определения антител, более простые и доступные, чем молекулярные методы, не применимы на ранних стадиях заболевания, поскольку для формирования иммунного ответа требуется, по крайней мере, пара недель [12, 16]. Поэтому обнаружение антител к SARS-CoV-2 можно использовать как подтверждающий тест при диагностике заболевания, но оно приобретает первостепенное значение при оценке популяционного иммунитета, возникшего в результате заболевания или вакцинации [19, 22, 23]. Более того, одним из методов лечения тяжелых форм COVID-19 является использование плазмы крови реконвалесцентов с высоким содержанием специфических антител, для чего также нужны надежные методы диагностики [17]. Учитывая острую потребность в серодиагностике COVID-19, в нашей стране и за рубежом разработан ряд таких тест-систем. Они различаются как по способам проведения тестирования (иммуноферментный анализ, хемилюминисцентный анализ или метод хроматографии), так и по использованным антигенам коронавируса, к которым направлены антитела [5, 10, 15, 18]. Отсутствие сведений об особенностях формирования гуморального иммунного ответа на SARS-CoV-2 и указанные различия тест-систем порождают казусы с «отсутствием» антител у переболевших или «исчезновением» антител буквально в считанные недели после заболевания. В связи с вышесказанным, исследование антител к SARS-CoV-2 в сыворотках реконвалесцентов в параллельном тестировании на разных тест-системах и разными методами поможет оценить не только чувствительность и специфичность, но и возможные рамки применения тех или иных тест-систем.

Целью настоящего исследования было сравнение диагностической чувствительности и специфичности пяти тест-систем для обнаружения антител класса IgG к вирусу SARS-CoV-2, основанных на разных методах диагностики.

Материалы и методы

Материалом исследования были образцы сыворотки крови от 137 реконвалесцентов COVID-19, обратившихся в Центр крови имени О.К. Гаврилова г. Москвы с целью сдать плазму крови для лечения больных новой коронавирусной инфекцией и 166 доноров крови и ее компонентов. У всех реконвалесцентов был подтвержденный клинический диагноз COVID-19. Потенциальных доноров до донации обследовали методом экспресс-анализа. Лица, у которых были выявлены анти-SARS-CoV-2 IgM-антитела, были отведены от донации. В сравнительное исследование включены 166 образцов сыворотки доноров, у которых были выявлены IgG-антитела к вирусу SARS-CoV-2 в экспресс-тесте. ПЦР-тестирование у этих доноров не проводилось, и информация о заболевании COVID-19 отсутствовала.

Образцы сыворотки от реконвалесцентов тестировали методом хемилюминисценции с использованием автоматического анализатора серии CL и реагентов фирмы Mindray (КНР) SARS-CoV-2 IgM и SARS-CoV-2 IgG и иммуноферментным методом на наборах компании АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) SARS-COV-2-IgM-ИФА-БЕСТ и SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ. Контрольную группу составили 50 сывороток крови от сотрудников Центра крови имени О.К. Гаврилова, собранные в начале 2019 года, и 19 сывороток от условно здоровых доноров, собранные в 2018 году (до появления вируса SARS-CoV-2) и хранившиеся при -70°C .

Образцы доноров крови и ее компонентов исследовали в 6 аналитических системах: экспресс-тест COVID-19 IgM/IgG Rapid Test (Colloidal Gold) (КНР), на автоматическом иммунохимическом анализаторе Abbott Architect™ i2000 и реагентах SARS-CoV-2-IgG (Abbot, Chicago, IL, США), методом хемилюминисценции с исполь-

ТАБЛИЦА 1. ИССЛЕДОВАННЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ АНАЛИЗА АНТИТЕЛ К ВИРУСУ SARS-CoV-2

TABLE 1. INVESTIGATED IMMUNOASSAYS FOR THE ANALYSIS OF ANTIBODIES TO THE SARS-CoV-2 VIRUS

Тест-система Kit	SARS-CoV-2 антиген SARS-CoV-2 antigen	Производитель Manufacturer	Платформа Method	Интерпретация результатов Interpreting results
SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ SARS-CoV-2-IgM-IFA-BEST	На основе смеси N-белка и RBD (receptor binding domain, рецептор-связывающий домен) S-белка Based on a mixture of N-protein and RBD (receptor binding domain) S-protein	АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск Vector-Best JSC, Novosibirsk	Иммуноферментный метод Enzyme linked immunoassay	КП < 0,8 отрицательный; 0,8 < 1,1 сомнительный; > 1,1 положительный Positivity coefficient (PC) < 0.8 negative, 0,8 < 1.1 equivocal, > 1.1 positive
SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ SARS-CoV-2-IgG-IFA-BEST	На основе полноразмерного тримера S-белка Based on full length S-protein trimer	АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск Vector-Best JSC, Novosibirsk	Иммуноферментный метод Enzyme linked immunoassay	КП < 0,8 отрицательный; 0,8 < 1,1 сомнительный; > 1,1 положительный PC < 0.8 negative, 0,8 < 1.1 equivocal, > 1.1 positive
ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G DS-IFA-ANTI-SARS-CoV-2-G	На основе нуклеокапсидного (N) и spike (S) белков Based on nucleocapsid (N) and spike (S) proteins	ООО «Диагностические системы», г. Нижний Новгород Research and Production Company Diagnostic Systems LLC, Nizhny Novgorod	Иммуноферментный метод Enzyme linked immunoassay	КП < 0,8 отрицательный; 0,8 < 1,2 сомнительный; > 1,2 положительный PC < 0.8 negative, 0,8 < 1.2 equivocal, > 1.2 positive
SARS-CoV-2-IgG-ИФА SARS-CoV-2-IgG-IFA	На основе домена RBD S-белка Based on RBD S-protein	ООО «Хема» ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России Xema LLC National Research Center for Hematology	Иммуноферментный метод Enzyme linked immunoassay	КП < 0,9 отрицательный; 0,9 < 1,0 сомнительный; > 1,1 положительный PC < 0.9 negative, 0,9 < 1.0 equivocal, > 1.1 positive
SARS-CoV-2 IgM	На основе смеси N-белка и RBD-участка S-белка Based on a mixture of N-protein and RBD S-protein	Mindray, KHP Mindray, China	Хемилюминисцентный метод Chemiluminescent assay	Индекс S/C < 1,0 отрицательный; ≥ 1,1 положительный Index S/C < 1.0 negative, ≥ 1.1 positive
SARS-CoV-2 IgG	На основе смеси N-белка и RBD-участка S-белка Based on a mixture of N-protein and RBD S-protein	Mindray, KHP Mindray, China	Хемилюминисцентный метод Chemiluminescent assay	Индекс S/C < 10 отрицательный; ≥ 10 положительный Index S/C < 10 negative, ≥ 10 positive
SARS-CoV-2-IgG	На основе N-белка N-protein based	Abbott, США Abbott, USA	Хемилюминисцентный метод на микрочастицах Chemiluminescent microparticle immunoassay	Индекс S/C < 1,4 отрицательный; ≥ 1,4 положительный Index S/C < 1.4 negative, ≥ 1.4 positive
COVID-19 IgM/IgG Rapid Test (Colloidal Gold)	Рекомбинантный SARS-CoV-2 антиген Recombinant SARS-CoV-2 antigen	Jiangsu Well Biotech Co., Ltd, KHP Jiangsu Well Biotech Co., Ltd, China	Иммунохроматография Immunocromatographic	Окрашенные полоски Dyed stripes

зованием автоматического анализатора серии CL и реагентов фирмы Mindray (КНР) SARS-CoV-2 IgG и иммуноферментным методом на наборах компаний ООО «Диагностические системы» (г. Нижний Новгород) ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G, ООО «Хема» (ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России) SARS-CoV-2-IgG-ИФА и компании АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ. Исследованные тест-системы различались как по методу определения, так и по использованным в них антигенам вируса SARS-CoV-2 (табл. 1). Образцы тестировали в течение одного дня партиями согласно протоколу производителя.

Для ИФА сыворотки разбавляли до конечного разведения в 100 раз в буфере для образцов и инкубировали при 37 °С в течение указанного времени в инструкции для каждой тест-системы соответственно в 96-луночном планшете с последующими циклами промывки и инкубации по каждому протоколу, включая контроли. Оптическую плотность (ОП) измеряли при 450 нм. Все исследования проводили на автоматическом анализаторе открытого типа Эволис (Bio-Rad, США). Коэффициент позитивности (КП) рассчитывали и результаты интерпретировали согласно протоколу каждого производителя.

Экспресс-тест COVID-19 IgG/IgM представляет собой иммунохроматографический анализ для качественного определения антител IgG и IgM к SARS-CoV-2 в пробах цельной крови. Во время тестирования проба реагирует с частицами, покрытыми антигеном SARS-CoV-2 в тест-кассете, учитывали результат согласно инструкции производителя:

- если проба содержит антитела IgG к SARS-CoV-2, в области тестовой линии IgG появится цветная линия;
- если проба содержит антитела IgM к SARS-CoV-2, в области тестовой линии IgM появится цветная линия;
- если проба не содержит антител к SARS-CoV-2, цветная линия не проявится ни в одной из областей тестовой линии, что указывает на отрицательный результат. Для контроля процедуры тестирования, в области контрольной линии всегда проявляется цветная полоска, указывающая на то, что был использован правильный объем пробы и произошло впитывание пробы мембраной.

Полученные результаты обработали методами вариационной статистики (программный пакет Microsoft Excel). Для ROC-анализа использовали пакет статистического программного обеспечения SPSS 16.0 (SPSS Inc., США). Уровень $p < 0,05$ считали значимым. Для выявления корреляций

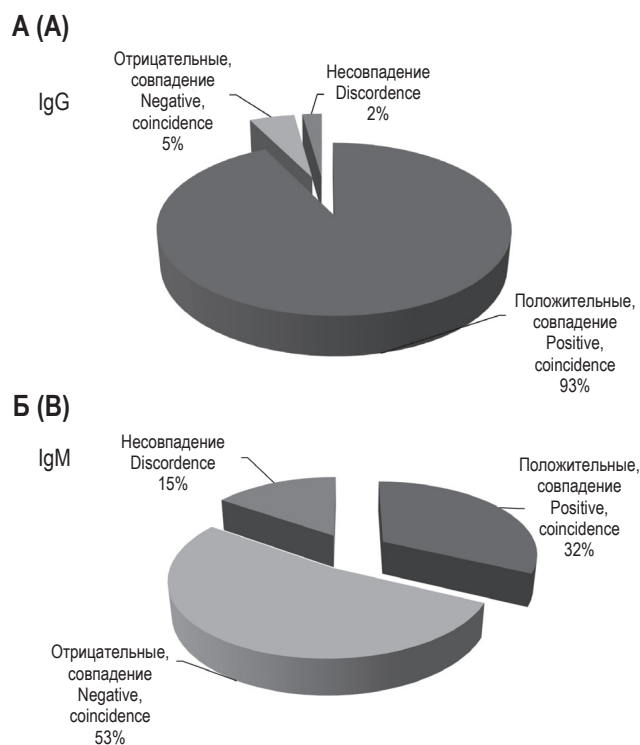


Рисунок 1. Сопоставление результатов тестирования сывороток крови на наборах фирмы Mindray и «Вектор-Бест» (группа 1)

Примечание. А – IgG-антитела. Б – IgM-антитела.

Figure 1. Comparison of serum test results using Mindray and Vector-Best kits (group 1)

Note. A, IgG antibodies. B, IgM antibodies.

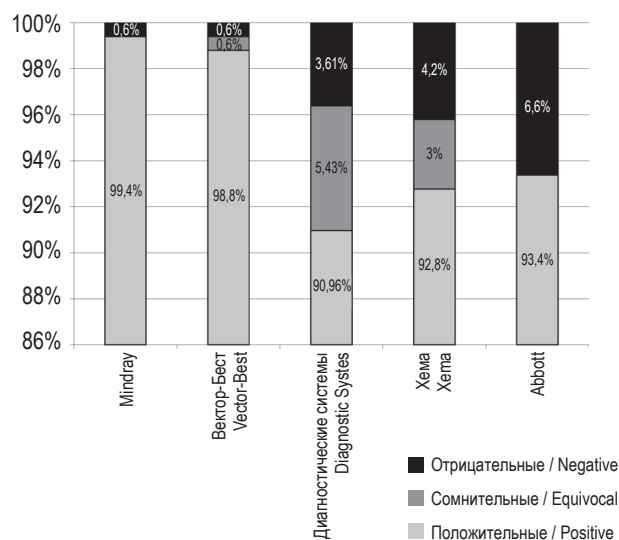


Рисунок 2. Результаты тестирования сывороток крови на наличие IgG-антител к антигенам вирусов SARS-CoV-2 на наборах исследованных фирм-производителей (группа 2)

Figure 2. Results of serum testing for the presence of IgG antibodies to the antigens of SARS-CoV-2 viruses on the kits of investigated manufacturers (group 2)

ТАБЛИЦА 2. ВЫЯВЛЯЕМОСТЬ IgG-АНТИТЕЛ К ВИРУСУ SARS-CoV-2 В СЫВОРОТКАХ ДОНОРОВ КРОВИ
TABLE 2. DETECTION OF IgG ANTIBODIES TO SARS-CoV-2 VIRUS IN SERA OF BLOOD DONORS

	Mindray	Вектор-Бест Vector-Best	Диагностические системы Diagnostic Systems	Хема Xema	Abbott
Положительные Positive	165	164	151	154	155
Сомнительные Equivocal	–	1	9	5	–
Отрицательные Negative	1	1	6	7	11

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ ТЕСТ-НАБОРАМИ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ
TABLE 3. CORRELATION BETWEEN TEST KITS FROM DIFFERENT MANUFACTURERS

Тест-система Kit	Mindray	Вектор-Бест Vector-Best	Диагностические системы Diagnostic Systems	Хема Xema	Abbott
Mindray	–	0,45	0,72	0,63	0,81
Вектор-Бест Vector-Best	–	–	0,32	0,73	0,52
Диагностические системы Diagnostic Systems	–	–	–	0,48	0,57
Хема Xema	–	–	–	–	0,67

ТАБЛИЦА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ROC-АНАЛИЗА ВЫЯВЛЯЕМОСТИ IgG-АНТИТЕЛ К ВИРУСУ SARS-CoV-2 В СЫВОРОТКАХ ДОНОРОВ КРОВИ
TABLE 4. RESULTS OF THE ROC-ANALYSIS OF THE DETECTION OF IgG ANTIBODIES TO THE SARS-CoV-2 VIRUS IN THE SERA OF BLOOD DONORS

Тест-система Kit	Cut-off	Площадь под кривой Area under curve	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %
Abbot	1,4	0,988	97,3	92,8
Вектор-Бест Vector-Best	1,1	0,998	99,4	95,8
Диагностические системы Diagnostic Systems	1,2	0,908	82,8	93,3
Mindray	10	0,996	98,8	98,1
Хема Xema	1,1	0,952	95,5	84,6

между различными признаками использовали критерий Пирсона.

Результаты

При исследовании уровня антител в 137 образцах плазмы реконвалесцентов было установлено, что в 127 (92,7%) образцах IgG-антитела к вирусу SARS-CoV-2 были обнаружены при использовании обоих наборов, у 7 пациентов были получены отрицательные результаты на обоих наборах, еще у трех образцов результаты не совпали: 2 образца были отрицательные на наборах Mindray, но при этом положительные на наборе

«Вектор-Бест», и один образец отрицательный на наборах «Вектор-Бест», и положительный на наборе Mindray (рис. 1А). При этом надо отметить, что для образцов с дискордантными результатами значения результатов были близкими к значениям cut-off (ОП/ОП крит), т.е. имели низкие концентрации антител. На основании полученных результатов антитела IgG к SARS-CoV-2 выявлены у 93,4% реконвалесцентов на наборе Mindray, на наборе «Вектор-Бест» – у 94,1%. Процент несовпадений – 2,2%. Интересно, что при тестировании на наборе Mindray у 58,4% сывороток КП был более 5 cut-off, тогда как на наборе

«Вектор-Бест» — 92,7% сывороток имели КП более 5 cut-off. Корреляционная связь между КП, определенными в этих двух тест-системах, была расценена как слабая $r = 0,45$.

При исследовании на наличие антител к антигенам вируса SARS-CoV-2 класса IgM тех же 137 реконвалесцентов были получены следующие результаты: в обоих тестах положительными были 44 образца (32,1%), еще 15 образцов были положительными на наборе «Вектор-Бест» и отрицательными на Mindray, и 6 образцов были положительными на Mindray и отрицательными на «Вектор-Бест» (рис. 1Б). При этом, специфические антитела IgM к SARS-CoV-2 на наборе Mindray обнаружены у 36% реконвалесцентов, а на наборах «Вектор-Бест» — у 43,1%. Таким образом у 52,6% реконвалесцентов не было обнаружено специфических IgM-антител к вирусу SARS-CoV-2 в обеих тест-системах. Процент несовпадений составил 15,3%.

Во второй части исследования 166 сывороток доноров крови, имевших антитела класса IgG, выявленные с помощью экспресс-метода, протестировали еще на 5 тест-системах. Результаты представлены в таблице 2 и на рисунке 2. Из 166 образцов отрицательной в 5 тест-системах оказалась 1 сыворотка (0,6%). По-видимому, это ложноположительный результат, полученный на тест-полосках. На тест-системе Mindray IgG-антитела к антигенам вируса SARS-CoV-2 выявлены в 165 образцах (99,4%), на «Вектор-Бест» — в 164 сыворотках (98,8%), на «Диагностических системах» — в 151 (90,96%), на «Хема» — в 154 (92,8%), а на Abbott — в 155 образцах (93,4%). При этом 135 образцов были положительными во всех тест-системах (рис. 3), что составило 81,33%, тогда как 30 образцов имели дискордантные результаты (18,07%). Важно, что в 9 сыворотках специфических IgG не обнаруживалось в 2 и более тест-системах.

Были оценены корреляционные связи между КП во всех парах исследуемых нами наборов. Результаты расчетов представлены в таблице 3. Одна пара имеет сильную корреляционную связь, это Mindray и Abbott ($r = 0,81$). Корреляционную связь средней силы имеют следующие пары наборов: Mindray — Диагностические системы, Mindray — Хема, Вектор-Бест — Хема и Хема — Abbott, Вектор-Бест — Abbott, Диагностические системы — Abbott. Слабо коррелируют следующие пары наборов: Mindray — Вектор-Бест, Вектор-Бест — Диагностические системы, Диагностические системы — Хема.

Для определения диагностической чувствительности тест-систем на IgG-антитела к SARS-CoV-2 дополнительно были протестированы на наборах Mindray 50 сывороток крови от сотруд-

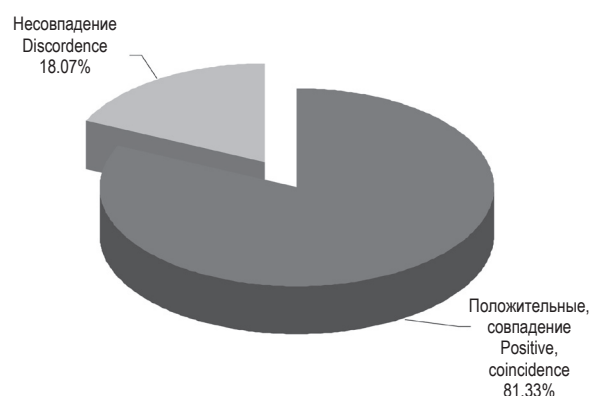


Рисунок 3. Сопоставление результатов тестирования сывороток крови на наборах пяти фирм-производителей (группа 2)

Figure 3. Comparison of serum test results using kits from five manufacturers (group 2)

ников Центра крови, собранные в начале 2019 года; на наборах «Вектор-Бест» — 19 сывороток от условно здоровых доноров, собранные в 2018 году; на наборах «Диагностические системы», Abbott и «Хема» были протестированы по 4 отрицательные сыворотки, кроме того, отрицательными считали сыворотки, чьи результаты были отрицательными в 2 и более тест-системах (9 проб). Проведенные расчеты продемонстрировали высокую диагностическую ценность всех исследованных тест-систем (табл. 4). Площади под ROC-кривой находились в диапазоне от 0,908 до 0,998, что свидетельствует о высоком качестве разделительной модели положительных и отрицательных образцов ($p < 0,001$). При заданных производителями тест-систем cut-off чувствительность и специфичность находилась в диапазоне от 82,8% и 93,3% для набора «Диагностические системы» до 99,4% и 95,8% для набора «Вектор-Бест» (табл. 4).

Обсуждение

Потребность в сопоставлении различных методов и тест-систем разных производителей для диагностики антител к антигенам вируса SARS-CoV-2, сертифицированных в РФ, связана с различиями в составе антигенов, используемых для выявления антител и наличием в крови переболевших COVID-19, спектра антител к разным белкам вируса [12]. Более того, не у всех переболевших COVID-19, имевших положительный ПЦР-анализ на SARS-CoV-2, формируются специфические антитела [23], а у разных пациентов преобладают антитела к разным белкам вируса [19, 20]. Так в наших исследованиях IgG-антитела к антигенам вируса SARS-CoV-2 в сыворотках крови реконвалесцентов были выявлены в 93,4% случаев с помощью набора Mindray и 94,1%

на наборе «Вектор-Бест». Похожие результаты были получены на наборах «Вектор-Бест», антитела у переболевших выявлялись в 68,9-95,5% случаев [1, 3]. Антитела класса IgM выявлялись реже: у 52,6% реконвалесцентов IgM-антител обнаружено не было, у 15,3% IgM-антитела определялись только в одной из тест-систем. Возможно, выявленные расхождения связаны с различиями в антигенах SARS-CoV-2, используемых в наборах Mindray и «Вектор-Бест». При исследовании иммунного ответа у перенесших COVID-19 было установлено, что у 47% пациентов более сильный IgM-ответ формируется на RBD-домен, у 50% — IgM синтезируется в одинаковой степени как к нуклеокапсиду, так и к RBD, а у 3% только на N-белок вируса [2]. В ряде исследований показано, что через неделю от появления симптомов заболевания чувствительность различных тест-систем для выявления антител крайне низкая, она повышается к 14 дню заболевания и после этого срока становится максимальной [2, 4, 9, 11]. Поскольку такая зависимость выявляется на разных тест-системах и разными методами исследования, то связана она не с особенностями тестирования, а с динамикой иммунного ответа. Следует помнить, что симптомы появляются не мгновенно, а спустя несколько дней после инфицирования, поэтому при вакцинации первые антитела резонно смотреть не ранее, чем через 3 недели после введения препарата. Рассчитанные нами чувствительность и специфичность для набора Mindray хорошо коррелирует с данными других исследователей: 100% чувствительности и 93,4% специфичности [14]. По данным фирмы разработчика, чувствительность составила 96,25%. По имеющимся в литературе данным для наборов Abbot чувствительность и специфичность колебалась в пределах 93,4-100% и 95,1-98% соответственно [6, 9]. По данным самой фирмы-производителя, чувствительность и специфичность составили 80,5% и 95,1%, что хорошо коррелирует с нашими данными. Для других наборов в доступной нам литературе не нашли информации о чувствительности. Хема в инструкции к набору указал диагностическую чувствительность 96,96% (93,5-100%), Диагностические системы указал чувствительность для нескольких групп, например, в группе заболевших менее 1 недели 66,7% положительных, в группе 8-14 дней 85,7%, в группе 15-21 день 100%. Полученные нами значения чувствительности и специфичности вполне соответствуют данным фирм-производителей.

Рассчитанные нами корреляции между разными тест-системами отражают, по-видимому, антигенный состав белков вируса SARS-CoV-2, использованный в том или ином наборе. Так самые сильные корреляции были получены между результатами тестирования Abbot (N-белок

и Mindray (смесь N-белка и RBD-участка S-белка) — 0,81 и между Вектор-Бест (полноразмерный тример S-белка) и Хема (RBD-домен S белка) — 0,73. Другие пары демонстрировали корреляции меньшей силы. Важно, что в тех парах, у которых был использован похожий антиген (комбинация N-белка и RBD-участка S-белка или самого S-белка) коэффициент корреляции был выше, а если антиген был разный (N-белок в одной тест-системе и S-белок в другой), то коэффициент корреляции был ниже. В связи с этим динамику антител лучше смотреть на тест-системе одного производителя. Кроме того, в случае похожих, вроде бы, антигенов, различия между тест-системами могут быть связаны с посттрансляционными изменениями рекомбинантных белков, используемых в качестве антигенов, поскольку эти процессы проходят неодинаково у прокариот и эукариот. Дополнительные различия могут возникать на этапе переноса целевого анализируемого белка на твердую фазу, в результате возникающих конформационных изменений [4].

Считается, что большее количество антител вырабатывается против N-белка, который является наиболее распространенным белком среди вирусов, однако S-белок пепломера вируса SARS-CoV-2 показал высокую иммуногенность и является основной мишенью для вируснейтрализующих антител [13]. Полагают, что анти-N-антитела являются свидетелями перенесенной инфекции, а анти-S-антитела — нейтрализуют вирус. Поэтому вакцины от COVID-19 разрабатывают на основе S-белка. Существует также мнение, что уровни антител к N- и S-белкам снижаются со временем с разной скоростью. Возможно, для оценки защищенности от вируса SARS-CoV-2 следует измерять именно анти-S-антитела [7].

Таким образом, нам удалось показать, что все исследованные нами тест-системы и методы диагностики антител против вируса SARS-CoV-2 имеют высокую чувствительность и специфичность и пригодны для определения специфических антител у лиц, перенесших COVID-19. Анализируя собственные результаты и данные литературы выяснили, что различия в составе использованных в тест-системе антигенов могут приводить к несовпадению результатов, полученных на разных тест-системах, поэтому наблюдение за динамикой антител лучше проводить в тест-системах одной и той же фирмы-производителя. Тест-системы, в которых в качестве антигена использован N-белок коронавируса пригодны для раннего подтверждения перенесенного заболевания, так как эти антитела появляются первыми, следует помнить, что и исчезают из крови эти антитела прежде других. В то же время, N-белок находится внутри вириона, поэтому анти-N-

антитела не являются протективными. Для анализа продолжительности антительной защиты следует использовать тест-системы с антигеном S-белка (RBD). По нашему мнению, для оценки поствакцинального иммунитета после прививки «Спутник V» следует использовать тест-системы с антигеном S-белка (RBD), поскольку в этой

вакцине есть только S-белок коронавируса. А вот в вакцинах «ЭпиВакКорона» и «КовиВак» присутствует также и N-белок коронавируса, поэтому тест-системы с антигеном N-белка могут выявлять антитела после этих прививок, однако вируснейтрализующими свойствами обладают только анти-S-антитела.

Список литературы / References

1. Гильмутдинов Р.Г., Ишбулдина А.М., Тюкина Л.Ю., Захарова И.В., Кузнецов С.И., Жибурт Е.Б. Результаты обследования доноров-реконвалесцентов COVID-19 // Справочник заведующего КДЛ, 2020. № 10. С. 37-42. [Gilmudinov R.G., Ishbuldina A.M., Tyukina L.Yu., Zakharova I.V., Kuznetsov S.I., Zhiburt E.B. Results of the survey of COVID-19 convalescent donors. *Spravochnik zaveduyushchego KDL = Handbook of the Head of Clinical Diagnostic Laboratory*, 2020, no. 10, pp. 37-42. (In Russ.)]
2. Кувшинова И.Н., Некрасов Б.Г., Ливицкая Н.И., Молодых С.В., Рукавишников М.Ю. Чувствительность и специфичность наборов реагентов АО «Вектор-Бест» для выявления иммуноглобулинов разных классов к SARS-CoV-2 // Справочник заведующего КДЛ, 2020. № 10. С. 27-32. [Kuvshinova I.N., Nekrasov B.G., Livitskaya N.I., Molodykh S.V., Rukavishnikov M.Yu. Sensitivity and specificity of sets of reagents of JSC "Vector-Best" for the detection of immunoglobulins of different classes to SARS-CoV-2. *Spravochnik zaveduyushchego KDL = Handbook of the Head of Clinical Diagnostic Laboratory*, 2020, no. 10, pp. 27-32. (In Russ.)]
3. Кулешова С.В., Григорьева Е.В. Опыт определения антител к SARS-CoV-2-возбудителю новой коронавирусной инфекции // Справочник заведующего КДЛ, 2020. № 9. С. 9-15. [Kuleshova S.V., Grigorieva E.V. Experience in determining antibodies to SARS-CoV-2, the causative agent of a new coronavirus infection. *Spravochnik zaveduyushchego KDL = Handbook of the Head of Clinical Diagnostic Laboratory*, 2020, no. 9, pp. 9-15. (In Russ.)]
4. Bonelli F., Sarasini A., Zierold C., Calleri M., Bonetti A., Vismara C., Blocki F.A., Pallavicini L., Chinali A., Campisi D., Percivalle E., DiNapoli A.P., Perno C.F., Baldantib F. Clinical and analytical performance of an automated serological test that identifies S1/S2-neutralizing IgG in COVID-19 patients semiquantitatively. *J. Clin. Microbiol.*, 2020, Vol. 58, Iss. 9, e01224-20. doi: 10.1128/JCM.01224-20.
5. Bryan A., Pepper G., Wener M.H., Fink S.L., Morishima C., Chaudhary A., Jerome K.R., Mathias P.C., Greninger A.L. Performance characteristics of the abbott architect SARS-CoV-2 IgG assay and seroprevalence in Boise, Idaho. *J. Clin. Microbiol.*, 2020, Vol. 58, no. 8, e00941-20. doi: 10.1128/JCM.00941-20.
6. Jääskeläinen A.J., Kuivanen S., Kekäläinen E., Ahava M.J., Loginov R., Kallio-Kokko H., Vapalahti O., Jarva H., Kurkela S., Lappalainen M. Performance of six SARS-CoV-2 immunoassays in comparison with microneutralisation. *J. Clin. Virol.*, 2020, Vol. 129, 104512. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104512.
7. Kohmer N., Westhaus S., Rüha C., Ciesek S., Rabenau H.F. Brief clinical evaluation of six high-throughput SARS-CoV-2 IgG antibody assays. *J. Clin. Virol.*, 2020, Vol. 129, pp. 104480. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104480.
8. Loeffelholz M.J., Tang Y.-W. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections – the state of the art. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, Vol. 9, pp. 747-756.
9. Meschi S., Colavita F., Bordini L., Matusali G., Lapa D., Amendola A., Vairo F., Ippolito G., Capobianchi M.R., Castilletti C. Performance evaluation of Abbott ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG immunoassay in comparison with indirect immunofluorescence and virus microneutralization test. *J. Clin. Virol.*, 2020, Vol. 129, 104539. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104539
10. Montesinos I., Gruson D., Kabamba B., Dahma H., Van den Wijngaert S., Reza S., Carbone V., Vandenberg O., Gulbis B., Wolff F., Rodriguez-Villalobos H. Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *J. Clin. Virol.*, 2020, Vol. 128, 104413. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104413.
11. Nicol T., Lefeuvre C., Serri O., Pivert A., Joubaud F., Dubée V., Kouatchet A., Ducancelle A., Lunel-Fabiani F., le Guillou-Guillemette H. Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). *J. Clin. Virol.*, 2020, Vol. 129, 104511. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104511.
12. Okba N.M.A., Müller M.A., Li W., Wang C., Geurtsvan-Kessel C.H., Corman V.M., Lamers M.M., Sikkema R.S., de Bruin E., Chandler F.D., Yazdanpanah Y., Le Hingrat Q., Descamps D., Houhou-Fidouh N., Reusken C.B.E.M., Bosch B.-J., Drosten C., Koopmans M.P.G., Haagmans B.L. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease 2019 patients. *Emerg. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 26, no. 7, pp. 1478-1488.
13. Ou X., Liu Y., Lei X., Li P., Mi D., Ren L., Guo L., Guo R., Chen T., Hu J., Xiang Z., Mu Z., Chen X., Chen J., Hu K., Jin Q., Wang J., Qian Z., Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, 1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.

14. Padoan A., Cosma C., Zaupa P., Plebani M. Analytical and diagnostic performances of a high-throughput immunoassay for SARS-CoV-2 IgM and IgG. *medRxiv*, 2020. Available at: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.20.20235267v1.full>.
15. Pan Y., Li X., Yang G., Fan J., Tang Y., Zhao J., Long X., Guo S., Zhao Z., Liu Y., Hu H., Xue H., Li Y. Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients. *J. Infect.*, 2020, Vol. 81, no. 1, pp. e28-e32.
16. Petherick A., Developing antibody tests for SARS-CoV-2. *Lancet*, 2020, Vol. 395, pp. 1101-1102.
17. Rajendran K., Krishnasamy N., Rangarajan J., Rathinam J., Natarajan M., Ramachandran A. Convalescent plasma transfusion for the treatment of COVID-19: systematic review. *J. Med. Virol.*, 2020, Vol. 92, no. 9, pp. 1475-1483.
18. Tang M.S., Hock K.G., Logsdon N.M., Hayes J.E., Gronowski A.M., Anderson N.W., Farnsworth C.W. Clinical performance of two SARS-CoV-2 serologic assays. *Clin. Chem.*, 2020, Vol. 66, no. 8, pp. 1055-1062.
19. Tang Y.-W., Schmitz J.E., Persing D.H., Stratton C.W. The laboratory diagnosis of COVID-19 infection: current issues and challenges. *J. Clin. Microbiol.*, 2020, Vol. 58, no. 6, e00512-20. doi: 10.1128/JCM.00512-20.
20. Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, pp. 363-374.
21. Vashist S.K. *In vitro* diagnostic assays for COVID-19: recent advances and emerging trends. *Diagnostics*, 2020, Vol. 10, 202. doi: 10.3390/diagnostics10040202.
22. World Health Organization, Laboratory Biosafety Guidance Related to the Novel Coronavirus (2019-nCoV), 2020 (Accessed 03 March 2021). Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version1-1.pdf?sfvrsn=912a9847_2.
23. Xu Y., Xiao M., Liu X., Xu S., Du T., Xu J., Yang Q., Xu Y., Han Y., Li T., Zhu H., Wang M. Significance of serology testing to assist timely diagnosis of SARS-CoV-2 infections: implication from a family cluster. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, Vol. 9, pp. 924-927.
24. Yang Y., Yang M., Shen C., Wang F., Yuan J., Li J., Zhang M., Wang Z., Xing L., Wei J., Peng L., Wong G., Zheng H., Liao M., Feng K., Li J., Yang Q., Zhao J., Zhang Z., Liu L., Liu Y., Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. *medRxiv*, 2020. Available at: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.11.20021493v2>.
25. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, pp. 727-733.

Авторы:

Белякова В.В. — к.б.н., заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией ГБУЗ «Центр крови имени О.К. Гаврилова Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Майорова О.А. — д.м.н., профессор, главный врач ГБУЗ «Центр крови имени О.К. Гаврилова Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Иванова Н.В. — врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ «Центр крови имени О.К. Гаврилова Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Степанова И.Е. — врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ «Центр крови имени О.К. Гаврилова Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Смердова М.А. — ведущий специалист ЗАО «Вектор-Бест-Европа», Москва, Россия

Обрядина А.П. — д.б.н., заместитель генерального директора ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы», г. Нижний Новгород, Россия

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

Authors:

Belyakova V.V., PhD (Biology), Head, Centralized Clinical Diagnostic Laboratory, O. Gavrilov Blood Center, Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

Maierova O.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Medical Officer, O. Gavrilov Blood Center, Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

Ivanova N.V., Doctor for Clinical Laboratory Diagnostics, O. Gavrilov Blood Center, Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

Stepanova I.E., Doctor for Clinical Laboratory Diagnostics, O. Gavrilov Blood Center, Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

Smerdova M.A., Leading Specialist, Vector-Best-Europe CJSC, Moscow, Russian Federation

Obryadina A.P., PhD, MD (Biology), Deputy General Director, Research and Production Company Diagnostic Systems, Ltd., Nizhny Novgorod, Russian Federation

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

Поступила 06.03.2021
Принята к печати 16.09.2021

Received 06.03.2021
Accepted 16.09.2021

НАСТОРАЖИВАЮЩИЕ ПРИЗНАКИ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ: ЕСТЬ ЛИ ПОЛЬЗА?

Корсунский И.А.

ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Резюме. Первичные иммунодефицитные состояния являются группой заболеваний, являющихся следствием разнообразных генетических дефектов. В настоящий момент известно более 300 иммунодефицитов, большая часть которых негативно влияет на качество и продолжительность жизни, приводит к летальным исходам в первый год жизни ребенка. Наиболее тяжелыми и при этом достаточно частыми являются дефекты клеточного иммунитета. В настоящий момент считается, что частота встречаемости клинически значимых Т-лимфопений составляет 1:4000 живых новорожденных, а частота встречаемости клинически значимых клеточных первичных иммунодефицитов составляет 1:10000 живых новорожденных. Несмотря на широкие возможности лечения этих заболеваний, выживаемость пациентов низка. Это является следствием запоздалого выставления правильного диагноза и, соответственно, начала адекватной терапии. Раннее выявление первичных иммунодефицитных состояний является ключевым фактором успешности лечения пациентов с этими заболеваниями. Несмотря на то, что клинические настораживающие признаки были сформулированы более 25 лет назад, а их пропаганда является невероятно успешной, выставление правильного диагноза большинству пациентов с иммунодефицитами запаздывает на годы. Эта ситуация является следствием чрезвычайно широкого спектра клинических проявлений иммунодефицитов. В настоящий момент, существует несколько списков настораживающих признаков. Также существует подход, при котором настораживающие клинические признаки формулируются отдельно для разных узких специалистов. Все эти списки являются следствием неоднократных попыток повысить чувствительность и специфичность этого инструмента. Попытки эти каждый раз оказывались неудачными, так как незначительно повышали его эффективность. Работы иммунологов из Великобритании, Германии, Египта, США показали, что сформулировать список настораживающих признаков из только клинических и анамнестических показателей практически невозможно. По всей видимости, необходимо добавить скрининговые лабораторные методики.

Ключевые слова: первичные иммунодефициты, настораживающие признаки, эффективность

Адрес для переписки:

Корсунский Илья Анатольевич
ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского Департамента здравоохранения города Москвы»
141014, Россия, Московская обл., г. Мытищи, ул. 3-я Крестьянская, 9, кв. 109.
Тел.: 8 (903) 571-77-85.
E-mail: iliakors@gmail.com

Address for correspondence:

Korsunskiy Ilya A.
G. Speranskiy Children Hospital No. 9
141014, Russian Federation, Moscow region, Mytishchi,
3rd Krestyanskaya str., 9, apt 109.
Phone: 7 (903) 571-77-85.
E-mail: iliakors@gmail.com

Образец цитирования:

И.А. Корсунский «Настораживающие признаки иммунодефицитных состояний: есть ли польза?» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1405-1414.
doi: 10.15789/1563-0625-WSO-2144
© Корсунский И.А., 2021

For citation:

I.A. Korsunskiy "Warning signs of primary immunodeficiencies: are there any benefits?", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1405-1414.
doi: 10.15789/1563-0625-WSO-2144
DOI: 10.15789/1563-0625-WSO-2144

WARNING SIGNS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES: ARE THERE ANY BENEFITS?

Korsunskiy I.A.

G. Speranskiy Children Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

Abstract. Primary immunodeficiencies is a group of diseases resulting from a variety of genetic defects. At the present time, more than 300 immunodeficiencies are known, most of which negatively affect the quality and duration of life, leading to deaths in the first year of a child's life. Defects in cellular immunity are the most severe and at the same time quite frequent. It is currently known that the incidence of clinically significant T lymphopenias is 1:4000 live newborns, and the incidence of clinically significant cellular primary immune deficiencies is 1:10000 live newborns. Despite the extensive treatment options for these diseases, patient survival is low. This is a consequence between delayed setting of correct diagnosis and, accordingly, the beginning of adequate therapy. Early detection of primary immunodeficiencies is a key factor in the successful treatment of patients with these diseases. Despite the fact that clinical warning signs were formulated more than 25 years ago, and their promotion is incredibly successful, the correct diagnosis is delayed for most immunodeficient patients by years. This situation is due to extremely wide range of clinical manifestations in immunodeficient disorders. Currently, there are several lists of warning signs. There is also an approach by which the alarming clinical signs are formulated separately for different specialists. All these lists resulted from attempts to increase sensitivity and specificity of this instrument. Anyway, these attempts proved to be unsuccessful, since their effectiveness was only slightly increased. The studies of immunologists from Great Britain, Germany, Egypt, USA showed that it is almost impossible to formulate a list of warning signs from only clinical and anamnestic indexes. Apparently, addition of screening laboratory techniques is required.

Keywords: primary immunodeficiencies, warning signs, diagnostic efficacy

Введение

Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) представляют собой обширную группу врожденных нарушений иммунной системы, тяжелые формы которых приводят к летальным исходам в первые два года жизни, а менее тяжелые формы приводят к необратимым изменениям в организме, которые значительно снижают качество жизни человека [1, 20]. Выявление заболевания и назначение необходимой терапии для пациентов с ПИДС практически всегда являются запоздалыми [18] из-за отсутствия особенностей течения беременности, дороговизны и сложности иммунологических исследований, а также неспецифичности клинических проявлений иммунодефицитов. Клиническиестораживающие признаки первичных иммунодефицитных состояний были впервые опубликованы фондом имени Джеффри Моделла еще в 1993 году. Они были сформулированы на основании экспертных мнений ведущих специалистов того времени [16]. Пропагандастораживающих признаков среди врачей общей практики и педиатров всего мира внесла огромный вклад в информирование медицинской общественности о существовании первичных иммунодефицитов [22], однако их

чувствительность и специфичность стала исследоваться только в последние годы [15, 26].

В этой статье вашему вниманию предлагается обзор исследований эффективности общепринятыхстораживающих признаков первичных иммунодефицитных состояний и рассматриваются возможности их улучшения.

Настораживающие признаки иммунодефицитных состояний

Цель популяризациистораживающих признаков иммунодефицитных состояний — помощь врачам общей практики и педиатрам в определении необходимости иммунологического обследованияприходящих к ним пациентов [22].

Существует два спискастораживающих признаков первичных иммунодефицитных состояний — для детей и для взрослых. Педиатрический список состоит из первичного иммунодефицита в семейном анамнезе, четырех и более отитов за год, двух и более серьезных синуситов за год, двух и более пневмоний за год, двухмесячной антибиотикотерапии с недостаточным эффектом или необходимости внутривенного введения антибиотиков, рецидивирующих кожных абсцессов, плохого набора веса младенцем или задержки физического развития ребенка, двух и более тяжелых инфекций, включая септицемию и персистирующего кандидоза в ротовой

полости или иной грибковой инфекции [23]. Для взрослых настораживающие признаки выглядят немного иначе: два и более отита за год, два и более синусита за год вне обострения аллергии, одна пневмония в год более чем год, потеря веса из-за хронической диареи, повторяющиеся обострения вирусных инфекций, регулярная необходимость внутривенного введения антибиотиков, рецидивирующие абсцессы кожи или внутренних органов, рекуррентные грибковые заболевания, заболевания вызванные туберкулезоподобными бактериями, а также история первичного иммунодефицита в семейном анамнезе [25]. Также иногда к этим признакам добавляют осложнения вакцинации живыми вакцинами [9] и дополняют признак «ПИДС в семейном анамнезе» случаями летальных исходов от тяжелых инфекционных заболеваний в первые годы жизни предыдущих детей этих же родителей [11]. При нахождении у пациента хотя бы одного из перечисленных признаков врач общей практики должен заподозрить первичный иммунодефицит и отправить пациента на консультацию аллерголога-иммунолога. При этом, судя по всему, указанные признаки недостаточны для выявления человека с первичным иммунодефицитом [4], поскольку проявления заболевания могут быть и кожными [2, 7], и аутоиммунными [3, 10, 17], и гастроинтестинальными [13]. Даже однократный эпизод тяжелого инфекционного заболевания может быть признаком ПИДС [21].

Фонд имени Джеффри Моделла, иммунологи по всему миру десятилетиями активно и успешно [24] пропагандируют сформулированные более четверти века назад настораживающие признаки первичных иммунодефицитных состояний, но насколько они эффективны в клинической практике?

Чувствительность и специфичность настораживающих признаков

Великобритания

В 2011 году доктора из двух педиатрических иммунологических центров в Манчестере и в Ньюкасле проанализировали истории болезни 430 детей с первичными иммунодефицитами [26]. Из них 74 случая дефекта нейтрофилов или моноцитов, 92 ребенка с заболеваниями, связанными с В-лимфоцитами, 22 случая дефекта системы комплемента, 242 пациента с проблемами с Т-лимфоцитами. В таблице 1 вы можете увидеть частоту встречаемости каждого настораживающего признака в абсолютных и относительных числах у пациентов с отсутствием ПИДС и с установленными диагнозами иммунодефицитов.

В итоге значимыми оказались следующие настораживающие признаки: ПИДС в семейном анамнезе, необходимость внутривенного введе-

ния антибиотиков и отставание в физическом развитии. Для пациентов с дефектами системы комплемента, клинически значимой является исключительно семейная история заболевания [26].

Египет

В 2013 году египетские ученые провели ретроспективный анализ медицинской документации 204 пациентов каирской детской больницы университета Айн Шам. Разбору подверглись истории болезней 112 иммунологически здоровых детей и 92 пациентов со следующими диагнозами: 26 с тяжелыми комбинированными иммунными недостаточностями (ТКИН), 27 с дефицитами антител, 14 с атаксией-телеангиэктазией (АТА), 4 с гипер-IgE-синдромом (HIES), 3 больных синдромом Вискотта—Олдрича (WAS), по 1 с хроническим кожно-слизистым кандидозом, синдромами Ди Джорджи и Чедиака Хигаши, 8 с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ), 4 с дефектом адгезии лейкоцитов и 3 с конгенитальной нейтропенией. У каждого из пациентов с ПИДС был как минимум один из настораживающих признаков, в то время как 32 иммунологически здоровых пациента не показали ни одного [23]. В таблице 2 вы можете увидеть сравнение частоты встречаемости каждого настораживающего признака у пациентов с ПИДС и без.

Проанализировав эти данные, ученые получили 100%-ную чувствительность и 26%-ную специфичность при наличии одного из признаков. Иными словами, если полагаться на 1 найденный признак при решении вопроса об углубленном иммунологическом обследовании, в 3 случаях из 4 иммунологическое обследование проводится зря. При увеличении необходимого для направления на углубленное обследование количества настораживающих признаков резко падает чувствительность [23].

Германия

В 2015 году было опубликовано проспективное исследование эффективности настораживающих признаков первичных иммунодефицитных состояний 210 пациентов отделения детской онкологии, гематологии и клинической иммунологии Университета имени Генриха Гейне (Дюссельдорф). Период исследования май 2010 — май 2012 гг. [13].

Из 210 детей, чье состояние и данные анамнеза потребовали госпитализации в иммунологическое отделение, только 36 был установлен диагноз первичного иммунодефицитного состояния. Из них 22 ребенка с дефицитами антител, 4 с Т-клеточными дефектами, по 2 с гранулоцитарными, аутовоспалительными заболеваниями и синдромом Ди Джорджи, по 1 с АТА, синдромом Швахмана—Даймонда и ТКИН. 174 ребенка оказались иммунологически здоровы [14]. Хотя

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ НАСТОРАЖИВАЮЩИХ ПРИЗНАКОВ У ДЕТЕЙ С ПИДС И БЕЗ В ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕНТРАХ МАНЧЕСТЕРА И НЬЮКАСЛА [26]

TABLE 1. FREQUENCY OF OCCURRENCE OF WARNING SIGNS IN CHILDREN WITH PIDD AND WITHOUT IN THE IMMUNOLOGICAL CENTERS OF MANCHESTER AND NEWCASTLE [26]

	Иммунологически здоровые Immunologically healthy (n = 133), n (%)	ПИДС PIDD (n = 430), n (%)
ПИДС в семейном анамнезе Family history of PIDD	6 (4)	148 (34)
Две и более тяжелых инфекции за год Two or more severe infections per year	15 (11)	44 (10)
Две и более пневмонии за год Two or more pneumonia in a year	34 (26)	105 (24)
Рецидивирующие абсцессы (кожи и внутренних органов) Recurrent abscesses (skin and internal organs)	9 (7)	56 (13)
Рецидивирующие острые отиты Recurrent acute otitis media	47 (35)	64 (15)
Два и более синусита Two or more sinusitis	21 (16)	23 (5)
Персистирующая молочница Persistent thrush	5 (4)	63 (15)
Необходимость внутривенного введения антибиотиков Need for intravenous antibiotics	56 (42)	241 (56)
Два и более месяца оральной антибиотикотерапии с недостаточным эффектом Two or more months of oral antibiotic therapy with insufficient effect	3 (2)	75 (17)
Отставание в физическом развитии Lag in physical development	7 (3)	135 (31)

бы один настораживающий признак был выявлен у 12 из 36 (33%) детей с ПИДС и у 36 из 174 (21%) иммунологически здоровых детей. Ни одного признака не было выявлено у 24 (74%) детей с иммунодефицитом и у 138 (79%) без.

Таким образом, чувствительность 10 настораживающих признаков первичных иммунодефицитных состояний у детей оказалась 33%, а специфичность — 79%.

СПИД

В 2019 году в Journal of Clinical Immunology было опубликовано большое исследование эффективности настораживающих признаков иммунодефицитных состояний у детей и у взрослых. Для анализа были взяты истории болезней 115 детей (средний возраст — 9 лет) и 287 взрослых (средний возраст — 48 лет) пациентов с ПИДС, лечившихся в двух крупных медицинских центрах Кливленда в период 2006-2016 гг. [6]. Характеристика пациентов в таблицах 3 и 4. В качестве группы контроля выступили 2161 ребенок и 15412 взрослых с лабораторно доказанным отсутствием иммунологических заболеваний.

Максимальное количество настораживающих признаков показывают дети с HIES (7), MBL и PASLI (по 6). Минимальное количество настораживающих признаков у детей с WAS, IPEx и гипер IgM синдромом. Среднее количество настораживающих признаков иммунодефицитных состояний у детей — 2,3. Два и более признака можно найти у 64,3% детей с ПИДС. Наиболее значимые различия между иммунологически больными и здоровыми были определены в таких признаках, как повышенная частота пневмоний и серьезных бактериальных инфекций, отставание в физическом развитии, необходимость внутривенного введения антибиотиков при лечении инфекционных заболеваний и повышенная частота отитов (табл. 5).

Количество настораживающих признаков у взрослых пациентов ожидаемо ниже. Максимально — по 3 — у пациентов с APCCED и дефицитом CD8, ни одного у пациентов с WAS. Среднее количество признаков среди всех взрослых пациентов — 1,6. Рецидивирующие отиты и синуситы, повторяющиеся диареи и вирусные инфекции бывают значимо чаще у пациентов с ПИДС,

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ НАСТОРАЖИВАЮЩИХ ПРИЗНАКОВ У ДЕТЕЙ С ПИДС И БЕЗ В УНИВЕРСИТЕТСКОЙ БОЛЬНИЦЕ АЙН ШАМ [23]

TABLE 2. FREQUENCY OF OCCURRENCE OF WARNING SIGNS IN CHILDREN WITH AND WITHOUT PIDS AT AIN SHAM UNIVERSITY HOSPITAL [23]

Настораживающий признак Warning sign	Пациент с ПИДС PIDD n (%)	Пациент без ПИДС no PIDD n (%)
Четыре и более отита за год Four or more otitis media per year	19 (21)	0
Двухмесячная антибиотикотерапия с недостаточным эффектом Two-month antibiotic therapy with insufficient effect	36 (39)	0
Две и более пневмонии за год Two or more pneumonia in a year	52 (56)	41 (37)
Плохой набор веса младенцем Poor infant weight gain	54 (59)	37 (33)
Рецидивирующие абсцессы кожи или внутренних органов Recurrent abscesses of the skin or internal organs	26 (28)	0
Персистирующий кандидоз в ротовой полости или иная грибковая инфекция Persistent oral candidiasis or other fungal infection	19 (21)	1 (1)
Необходимость внутривенного введения антибиотиков Need for intravenous antibiotics	85 (92)	59 (53)
Две и более тяжелые инфекции Two or more severe infections	20 (22)	1 (1)
Первичный иммунодефицит в семейном анамнезе Family history of primary immunodeficiency	21 (23)	1 (1)

нежели у иммунологически здоровых взрослых (табл. 5).

Поскольку специфичность одного признака слишком низка, была посчитана чувствительность 2 и более признаков. Получилось, что два и более настораживающих признака можно найти лишь у 56% больных детей и у 44,9% больных взрослых [6].

Исследования с похожими неудовлетворительными результатами были проведены в Латинской Америке [8, 9] и Турции [5]. Все опубликованные к настоящему моменту расчеты указывают на необходимость пересмотра [6, 14, 19] настораживающих признаков иммунодефицитных состояний, а может и самого подхода к проблеме [19].

Предложенные модификации настораживающих признаков

Германия

В описанном в предыдущем разделе исследовании были определены чувствительность и специфичность не только 10 настораживающих признаков фонда имени Джеффри Моделла [14], но и настораживающие признаки немецкого пациентского сообщества (DSAI) [27], настораживающие признаки научного медицинского сообщества Германии (AWMF) [12],

а также разработанные авторами собственные Дюссельдорфские настораживающие признаки. Все инструменты показали недостаток чувствительности и/или специфичности [14]. Данные представлены в таблице 6.

США

Попытка увеличить эффективность предложенных фондом имени Джеффри Моделла настораживающих признаков путем добавления к ним в качестве дополнительных критериев аллергических, аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний не привела к ожидаемому результату [6]. Результаты в таблице 7.

Обсуждение

Наиболее интересная попытка видоизменить настораживающие признаки иммунодефицитных состояний была предложена Майклом О'Салливаном и Эндрю Кантом в 2012 году [19]. Ученые предложили разработать отдельные списки настораживающих признаков для разных специальностей. Были предложены подходы к выявлению пациентов с ПИДС неонатологам, дерматологам, гастроэнтерологам, ЛОР-врачам, инфекционистам, микробиологам и другим узким специалистам. Однако эта идея не нашла

ТАБЛИЦА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ПИДС ПЕДИАТРИЧЕСКИХ ОТДЕЛЕНИЙ МЕДИЦИНСКИХ ЦЕНТРОВ КЛИВЛЕНДА [6]

TABLE 3. CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH PIDD IN PEDIATRIC DEPARTMENTS OF CLEVELAND MEDICAL CENTERS [6]

Пол Gender	Количество Number
Мальчики Boys	66
Девочки Girls	49
Диагноз Diagnosis	
Синдром Ди Джорджи DiGeorge syndrome	62
Дефицит антител Antibody deficiency	23
Общая переменная иммунная недостаточность (ОВИН) CVID	16
Синдром Вискотта–Олдрича WAS	3
Дефицит комплемента Complement deficiency	2
Неизвестно Unknown	2
Дефицит аденозиндезаминазы ADA	1
Агаммаглобулинемия	1
Гипер-IgE-синдром HIES	1
Гипер-IgM-синдром Hyper IgM syndrome	1
Синдром иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии, энтеропатии, X-сцепленный IPEX	1
Дефицит маннон-связывающего лектина MLB	1
p110 дельта активирующая мутация, приводящая к старению Т-лимфоцитов, лимфаденопатии и иммунодефициту PASLI	1

ТАБЛИЦА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С ПИДС ОТДЕЛЕНИЙ МЕДИЦИНСКИХ ЦЕНТРОВ КЛИВЛЕНДА [6]

TABLE 4. CHARACTERISTICS OF ADULT PATIENTS WITH PIDS IN CLEVELAND MEDICAL CENTER DEPARTMENTS [6]

Пол Gender	Количество Number
Мужчины Men	105
Женщины Women	182
Диагноз Diagnosis	
ОВИН CVID	222
Синдром Ди Джорджи Di George syndrome	18
Дефицит антител Antibode deficiency	16
Гипер-IgE-синдром HIES	10
Дефицит комплемента Complement deficiency	7
Агаммаглобулинемия Agammaglobulinemia	3
Хроническая гранулематозная болезнь Chronic granulomatous disease	2
Синдром Вискотта–Олдрича WAS	2
Неизвестно Uknown	2
Дефицит CD8 CD8 deficiency	1
Гипер-IgM-синдром Hyper IgM syndrome	1
IPEX	1
Аутоиммунная полиэндокринопатия, кандидиозная эктодермальная дистрофия APECED	1
Нейтрофил-специфический дефицит гранул SGD	1

продолжения, так как главная и единственная задачастораживающих признаков — помогать выявлять пациентов с иммунодефицитом на как можно более ранней стадии заболевания. До узкого специалиста пациент доходит далеко не сразу, часто уже с осложнениями. Настораживаю-

щие признаки должны быть предложены врачам общей практики, семейным врачам, педиатрам широкого профиля [14].

Судя по всему, разработать инструмент исключительно из клинических признаков невозможно. Слишком велико разнообразие первич-

ТАБЛИЦА 5. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВСТРЕЧАЕМОСТИ НАСТОРАЖИВАЮЩИХ ПРИЗНАКОВ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ С ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ПАТОЛОГИЯМИ И БЕЗ [6]

TABLE 5. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE OCCURRENCE OF WARNING SIGNS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCY STATES IN CHILDREN AND ADULTS WITH AND WITHOUT IMMUNOLOGICAL PATHOLOGIES [6]

Настораживающий признак Warning sogn	Отношение шансов Odds ratio	p value	AUC
У детей In children			
Отиты Otitis	1,5	0,028	0,55
Синуситы Sinusitis	0,9	0,79	0,51
Пневмонии Pneumonias	2,9	1,2	0,54
Частая антибиотикотерапия Frequent antibiotic therapy	0,7	0,001	0,55
Задержка физического развития Delayed physical development	2,1	0,0003	0,58
Абсцессы Abscesses	0,7	0,41	0,51
Кандидоз Candidiasis	1,3	0,4	0,51
Необходимость в/в антибиотиков Need for IV antibiotics	2,1	0,001	0,59
Серьезные бактериальные инфекции Severe bacterial infections	4,8	0,001	0,56
Два и более любых признака Any two or more signs	1,8	0,0047	0,57
У взрослых In adult			
Отиты Otitis	2,9	0,001	0,53
Синуситы Sinusitis	2,1	0,001	0,57
Пневмонии Pneumonias	1,2	0,27	0,51
Диарея с потерей веса Diarrhea with weight loss	2,2	0,0009	0,52
Частые инфекции Frequent infections	3,3	0,001	0,57
Необходимость в/в антибиотиков Need for IV antibiotics	0,9	0,558	0,51
Абсцессы Abscesses	1,2	0,31	0,51
Кандидоз Candidiasis	1,5	0,06	0,51
Микоплазменные инфекции Mycoplasma infections	< 0,001	0,97	0,5
Два и более любых признака Any two or more signs	1,7	0,001	0,56

ТАБЛИЦА 6. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ НАСТОРАЖИВАЮЩИХ ПРИЗНАКОВ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ [14]

TABLE 6. SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF WARNING SIGNS OF IMMUNODEFICIENCY STATES [14]

	Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	PPV%	NPV%
JMF	33	79	25	85
DSAI	47	64	21	85
AWMF	69	37	19	86
Дюссельдорфский (максимальный NPV) Dusseldorf max NPV	75	51	24	91
Дюссельдорфский (максимальный индекс Юдена) Dusseldorf max Youden index	56	76	32	89

ТАБЛИЦА 7. ВСТРЕЧАЕМОСТЬ НАСТОРАЖИВАЮЩИХ ПРИЗНАКОВ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ С ДОБАВЛЕНИЕМ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ, АУТОИММУННЫХ И ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ С ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ПАТОЛОГИЯМИ И БЕЗ [14]

TABLE 7. INCIDENCE OF WARNING SIGNS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCY STATES WITH THE ADDITION OF ALLERGIC, AUTOIMMUNE AND LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES IN CHILDREN AND ADULTS WITH AND WITHOUT IMMUNOLOGICAL PATHOLOGIES [14]

Настораживающий признак Warning sign	Отношение шансов Odds ratio	p value	AUC
У детей In children			
Два и более любых признака + аллергические заболевания Any two or more signs + allergic diseases	0,3	0,001	0,66
Два и более любых признака + аутоиммунные заболевания Any two or more signs + autoimmune diseases	3,2	0,0012	0,58
Два и более любых признака + лимфопролиферативные заболевания Any two or more signs + lymphoproliferative diseases	1,6	0,228	0,57
У взрослых In adults			
Два и более любых признака + аллергические заболевания Any two or more signs + allergic diseases	1,2	0,13	0,57
Два и более любых признака + аутоиммунные заболевания Any two or more signs + autoimmune diseases	1,2	0,29	0,56
Два и более любых признака + лимфопролиферативные заболевания Any two or more signs + lymphoproliferative diseases	0,6	0,01	0,57

ных иммунодефицитов. Увеличение количества настораживающих признаков, их комбинирование не приводят к нужному результату.

Однако, несмотря на эти разочаровывающие данные, отказываться от дальнейших попыток усовершенствования инструментов выявления первичных иммунодефицитов нельзя. Иного пути обнаружения пациентов и, соответственно, постановки диагноза и начала необходимого им лечения нет.

Выводы

По-видимому, следует отказаться от идеи исключительно клинических признаков иммунодефицитных состояний. Как уже было сказано ранее, первичные иммунодефициты слишком разнообразны для описания их 10-12 симптомами. Необходим более сложный инструмент, включающий в себя и данные анамнеза, и клинические симптомы, и результаты доступной, используемой рутинно лабораторной диагностики.

В современных условиях, когда технический прогресс позволяет практически каждому че-

ловеку иметь в кармане смартфон или иной мобильный компьютер с доступом в интернет, а оснащение медицинских работников современными компьютерами и современным программным обеспечением вовсе становится обязательным, появляется возможность использования сложных инструментов диагностики и анализа в условиях рутинного приема. Или даже, в известных пределах, качественного анализа пациентом собственного состояния. Примеры достойных онлайн-платформ и мобильных приложений известны. Это разного рода справочники, медицинские калькуляторы, приложения для выявления болезни Альцгеймера, приложения для контроля бронхиальной астмы, приложения для оценки тяжести атопического дерматита, приложения для анализа на предмет вероятности генетических заболеваний и так далее. Ничто не мешает нам последовать примеру коллег и разработать подобный инструмент для оценки вероятности иммунодефицитного состояния и необходимости консультации узкого специалиста иммунолога.

Список литературы / References

1. Корсунский И.А., Гордукова М.А., Смирнова А.С., Мунблит Д.Б., Давыдова Н.В., Козлов И.Г., Протеус А.П., Корсунский А.А., Румянцев А.Г. Целесообразность неонатального скрининга первичных иммунодефицитных состояний // РМЖ, 2018. № 9. С. 29-32. [Korsunskiy I.A., Gordukova M.A., Smirnova A.S., Munblit D.B., Davydova N.V., Kozlov I.G., Prodeus A.P., Korsunskiy A.A., Rumyantsev A.G. Feasibility of Neonatal Screening for Primary Immunodeficiencies. *RMZh = Russian Medical Journal*, 2018, no. 9, pp. 29-32. (In Russ.)]
2. Al-Herz W., Nanda A. Skin Manifestations in Primary Immunodeficient Children. *Pediatr. Dermatol.*, 2011, Vol. 28, no. 5, pp. 494-501.
3. Arason G.J., Jorgensen G.H., Ludviksson B.R. Primary Immunodeficiency and Autoimmunity: Lessons From Human Diseases. *Scand. J. Immunol.*, 2010, Vol. 71, no. 5, pp. 317-328.
4. Arkwright P.D., Gennery A.R. Ten warning signs of primary immunodeficiency: a new paradigm is needed for the 21st century. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2011, Vol. 1238, no. 1, pp. 7-14.
5. Arslan S., Ucar R., Caliskaner A.Z., Reisli I., Guner S.N., Sayar E.H., Baloglu I. How effective are the 6 European Society of Immunodeficiency warning signs for primary immunodeficiency disease? *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, 2016, Vol. 116, no. 2, pp. 151-155.e1.
6. Bjelac J.A., Yonkof J.R., Fernandez J. Differing Performance of the Warning Signs for Immunodeficiency in the Diagnosis of Pediatric Versus Adult Patients in a Two-Center Tertiary Referral Population. *J. Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 39, no. 1, pp. 90-98.
7. Chu E.Y., Freeman A.F., Jing H., Cowen E.W., Davis J., Su H.C., Holland S.M., Turner M.L.C. Cutaneous Manifestations of DOCK8 Deficiency Syndrome. *Arch. Dermatol.*, 2012, Vol. 148, no. 1, pp. 79-84.
8. Condino-Neto A., Franco J.L., Trujillo-Vargas C., Espinosa-Rosales F.J., Leiva L.E., Rodriguez-Quiroz F., King A., Lagos M., Oleastro M., Bezrodnik L., Grumach A.S., Costa-Carvalho B.T., Sorensen R.U. Critical issues and needs in management of primary immunodeficiency diseases in Latin America. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)*, 2011, Vol. 39, no. 1, pp. 45-51.
9. Costa-Carvalho B.T., Grumach A.S., Franco J.L., Espinosa-Rosales F.J., Leiva L.E., King A., Porras O., Bezrodnik L., Oleastro M., Sorensen R.U., Condino-Neto A. Attending to warning signs of primary immunodeficiency diseases across the range of clinical practice. *J. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 34, no. 1, pp. 10-22.
10. Cunningham-Rundles C., Brandeis W.E., Pudifin D.J., Day N.K., Good R.A. Autoimmunity in selective IgA deficiency: relationship to anti-bovine protein antibodies, circulating immune complexes and clinical disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 1981, Vol. 45, no. 2, pp. 299-304.
11. de Vries E. in collaboration with European Society for Immunodeficiencies (ESID) members. Patient-centred screening for primary immunodeficiency, a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists: 2011 update. *Clin. Exp. Immunol.*, 2012, Vol. 167, no. 1, pp. 108-119.

12. Farmand S., Baumann U., von Bernuth H., Borte M., Foerster-Waldl E., Franke K., Habermehl P., Hapaun P., Klock G., Liese J., Marks R., Nebe T., Niehues T., Schuster V., Harnatz K., Witte T., Ehl S., Schulze I. Interdisziplinäre AWMF-Leitlinie zur Diagnostik von primären Immundefekten (S2k). *Klin. Pädiatr.*, 2011, Vol. 223, no. 06, pp. 378-385.
13. Kobrynski L.J.J., Mayer L. Diagnosis and treatment of primary immunodeficiency disease in patients with gastrointestinal symptoms. *Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 139, no. 3, pp. 238-248.
14. Lankisch P., Schiffner J., Ghosh S., Babor F., Borkhardt A., Laws H.J. The Duesseldorf warning signs for primary immunodeficiency: is it time to change the rules? *J. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 35, no. 3, pp. 273-279.
15. MacGinnitie A., Aloï F., Mishra S. Clinical characteristics of pediatric patients evaluated for primary immunodeficiency. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2011, Vol. 22, no. 7, pp. 671-675.
16. Modell V., Gee B., Lewis D.B., Orange J.S., Roifman C.M., Routes J.M., Sorensen R.U., Notarangelo L.D., Modell F. Global study of primary immunodeficiency diseases (PI) – diagnosis, treatment, and economic impact: an updated report from the Jeffrey Modell Foundation. *Immunol. Res.*, 2011, Vol. 51, no. 1, pp. 61-70.
17. Moraes-Vasconcelos D., Costa-Carvalho B.T., Torgerson T.R., Ochs H.D. Primary immune deficiency disorders presenting as autoimmune diseases: IPEX and APECED. *J. Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 28, no. S1, pp. 11-19.
18. Notarangelo L., Casanova J.L., Fischer A., Puck J., Rosen F., Seger R., Geha R., International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency diseases classification committee. Primary immunodeficiency diseases: An update. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004, Vol. 114, no. 3, pp. 677-687.
19. O'Sullivan M.D., Cant A.J. The 10 warning signs: A time for a change? *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 6, pp. 588-594.
20. Peshko D., Titova E., Korsunskiy I., Kondrikova E., Pulvirenti F., Quinti I., Blyuss O., Galvin A.D., Munblit D. Health-related quality of life in children and adults with primary immunodeficiencies: a systematic review and meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2019, Vol. 7, no. 6, pp. 1929-1957.
21. Picard C., von Bernuth H., Ghandil P., Chrabieh M., Levy O., Arkwright P.D., McDonald D., Geha R.S., Takada H., Krause J.C., Buddy Creech C., Ku C.L., Ehl S., Maródi L., Al-Muhsen S., Al-Hajjar S., Al-Ghonaim A., Day-Good N.K., Holland S.M., Gallin J.I., Chapel H., Speert D.P., Rodriguez-Gallego C., Colino E., Ben-Zion G., Roifman C., Hara T., Yoshikawa H., Nonoyama S., Domachowski J., Issekutz A.C., Tang M., Smart J., Zitnik S.E., Hoarau C., Kumararatne D.S., Thrasher A.J., Davies E.G., Bethune C., Sirvent N., de Ricard D., Camcioglu Y., Vasconcelos J., Guedes M., Bonito V.A., Rodrigo C., Almazán F., Méndez M., Aróstegui J.I., Alsina L., Fortuny C., Reichenbach J., Verbsky J.W., Bossuyt X., Doffinger R., Abel L., Puel A., Casanova J.L. Clinical features and outcome of patients With IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine*, 2010, Vol. 89, no. 6, pp. 403-425.
22. Pickett D., Modell V., Leighton I., Modell F. Impact of a physician education and patient awareness campaign on the diagnosis and management of primary immunodeficiencies. *Immunol. Res.*, 2008, Vol. 40, no. 1, pp. 93-94.
23. Reda S.M., El-Ghoneimy D.H., Afifi H.M. Clinical Predictors of Primary Immunodeficiency Diseases in Children. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2013, Vol. 5, no. 2, pp. 88-95.
24. Sediva A., Bataneant M., Belevtsev M., Blaziene A., Ciznar P., Förster-Waldl E., Kelecic J., Marodi J., Naumova E., Nasrullayeva G., Ress K., Serban M., Sitkauskienė B., Toth B., Modell V., Modell F., Tenenbaum V., Marković M., Avcin T. Primary immunodeficiencies in Central and Eastern Europe – the power of networking Report on the activity of the Jeffrey Modell Foundation Centers Network in Central and Eastern Europe. *Immunol. Res.*, 2019, Vol. 67, no. 4-5, pp. 358-367.
25. Soler-Palacín P., de Gracia J., González-Granado L.I., Martín C., Rodríguez-Gallego C., Sánchez-Ramón S., Lung ID-Signal Group. Primary immunodeficiency diseases in lung disease: warning signs, diagnosis and management. *Respir. Res.*, 2018, Vol. 19, no. 1, 219. doi: 10.1186/s12931-018-0923-8.
26. Subbarayan A., Colarusso G., Hughes S.M., Gennery A.R., Slatter M., Cant A.J., Arkwright P.D. Clinical Features That Identify Children With Primary Immunodeficiency Diseases. *Pediatrics*, 2011, Vol. 127, no. 5, pp. 810-816.
27. Wahn V. Das infektanfällige Kind. *HNO*, 2000, Vol. 48, no. 3, pp. 231-234.

Автор:

Корсунский И.А. — к.м.н., заведующий центром аллергологии и иммунологии ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Author:

Korsunskiy I.A., PhD (Medicine), Head, Center for Allergology and Immunology, G. Speranskiy Children Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

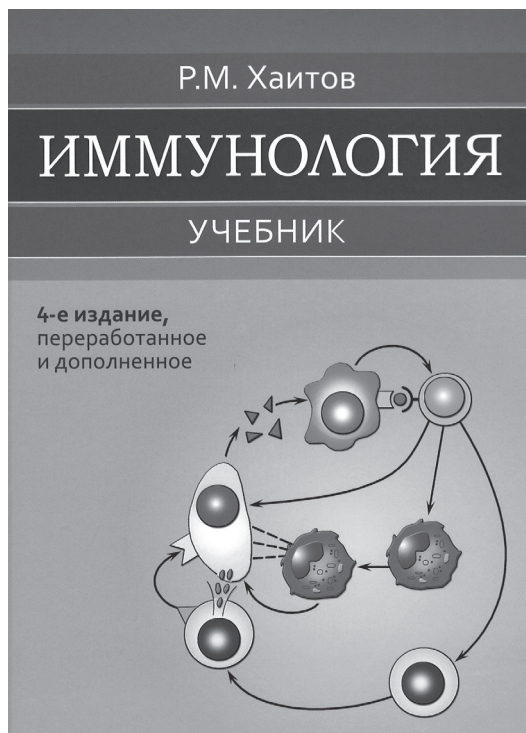
Поступила 16.10.2020

Принята к печати 09.01.2021

Received 16.10.2020

Accepted 09.01.2021

РЕЦЕНЗИЯ НА УЧЕБНИК «ИММУНОЛОГИЯ» (2021 г., АВТОР – АКАДЕМИК РАН Р.М. ХАИТОВ)



Учебник «Иммунология», 4-е издание (сентябрь 2021 г.), подготовил известный советский и российский ученый с мировым именем, иммунолог, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН Рахим Мусаевич Хаитов. Новое издание — это обновленная, переработанная и дополненная версия учебника, который за последние 15 лет стал одним из лучших учебников по иммунологии. Он используется повсеместно. По всей России и в странах СНГ по нему учатся студенты вузов медицинского и биологического профилей, по нему готовятся врачи, избравшие профессию аллергологов и иммунологов, им пользуются исследователи в самых разных естественных науках — иммунологии, аллергологии, микробиологии, вирусологии, инфектологии, вакцинологии и других смежных с ними науках. Словом, учебник «Иммунология» Р.М. Хаитова — это один из лучших в нашей стране, один из самых востребованных и признанных учебников.

В чем достоинства этого учебника? В чем причины успеха прежних изданий и основы для успеха нового, 4-го издания? Тут много факторов и все они важны:

- хороший, доступный язык изложения;
- множество иллюстраций, облегчающих понимание и освоение нового материала;
- простота объяснения очень сложных живых систем и процессов;
- широкий, практически всеобъемлющий охват областей иммунологии;
- современность, представление самых последних достижений в областях науки, которым учит этот учебник;
- достоверность и научное качество сведений, составляющих содержание учебника;
- практическая ориентированность научных знаний, всегда направленная на их полезное применение в интересах здоровья человека.

Современное научное знание об иммунитете — это огромный объем сведений. Учебник иммунологии должен помочь студентам медицинских или биологических вузов понять и запомнить самое важное и при этом не утопить обучающихся в изобилии научных фактов, способах их получения, значении этих знаний для нашей иммунной защиты от различных опасностей.

Доступность, иллюстрированность, простота

Сколь угодно сложные структуры и процессы, их взаимные влияния необходимо представить в учебнике для студентов в максимально упрощенном, понятном, виде. Упрощая, нельзя исказить природу живой системы, описываемых в ней объектов и событий. Недопустимо отойти от научного знания об этих объектах и явлениях, с ними связанных. Для схематизации и упрощения сложных процессов полезны графические иллюстрации, и к ним предъявляются те же требования — не исказить действительности, не сформировать ложных представлений, которые не соответствуют истинной природе описываемых объектов и явлений.

В учебнике Р.М. Хаитова схемы и пояснения к ним просты и понятны, вполне соответствуют строгим научным представлениям, достаточны для быстрого понимания и запоминания, что является несомненным достоинством этой книги.

Полнота охвата

Учебник иммунологии должен отразить или хотя бы обозначить все самые значительные области иммунологии. Именно таким и является учебник Р.М. Хаитова. При самом придирчивом анализе не удастся найти каких-либо значительных разделов современной иммунологии, которых бы не было в книге Р.М. Хаитова. Специализированные области иммунологии, такие как иммунология опухолей и иммунология старения, без сомнений, не включены в структуру этого учебника преднамеренно. Эти разделы иммунологии оставлены для самостоятельных, специализированных учебников, поскольку указанные области науки очень сложны и их целесообразно рассматривать отдельно, обстоятельно и всерьез. Впрочем, автор может восполнить этот пробел в следующем издании учебника, т.к. им опубликован ряд оригинальных и обзорных статей по этой теме. В частности, монография «Иммунитет и рак» (Р.М. Хаитов, З.Г. Кадагидзе, ГЭОТАР-Медиа, 2018). Это же касается и иммунологии старения. Р.М. Хаитов опубликовал достаточно экспериментальных и обзорных статей по иммунологии старения.

В учебнике Р.М. Хаитова есть все, что составляет содержание науки иммунология:

(а) понимание предназначения иммунитета, его особенной роли, границ ответственности этой системы в организме живого существа;

(б) знание, что функция иммунной защиты обеспечивается определенными типами клеток и молекул, процессами, в которых они участвуют и которые они выполняют;

(в) сведения о природе и свойствах многих сотен типов и подтипов клеток, стадий их развития и преобразования в ходе выполнения своих функций. Детальные знания о большом разнообразии веществ, обеспечивающих координированное функционирование клеточных сообществ и, в конечном счете, иммунную защиту живого существа;

(г) знания о процессах иммунного реагирования и иммунной защиты на всех уровнях: от уровня целого организма, его отдельных органов и систем до уровня клеток, молекул и атомов, составляющих эти молекулы, реакций, в которых происходят химические и физические превращения на молекулярном и супрамолекулярном уровнях.

Особо следует отметить, что значительная часть учебника посвящена патологическим процессам, при которых функционирование иммунной системы значительно нарушено — иммунные дефициты, аллергия, аутоиммунные болезни. Это несомненное достоинство учебника. В этих разделах фундаментальные знания иммунологии проецируются на клинически значимые, практически важные области медицины. Яркими примерами успешного клинического применения указан путь от фундаментальной иммунологии к практике медицины и здоровью человека, что очень важно при обучении нового поколения медиков и биологов.

(д) большой интерес представляет раздел по вакцинации. Сформулированы требования к вакцинирующим препаратам. Рассмотрены новые поколения вакцин, в том числе векторные вакцинирующие препараты (Гам-КОВИД-Вак) против новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, вакцины на основе нуклеиновых кислот (ДНК- и РНК-вакцины), аллерговакцины.

Современность и новизна

Учебник иммунологии обязан содержать фундаментальные знания, многие из которых добыты давно. Студенту необходимо узнать основополагающие факты, о которых ученые узнали год, десять или сто лет назад. Т. е. в учебнике должна быть представлена информация, ставшая классической и

неоднократно описанная во многих предшествующих учебниках и руководствах по иммунологии. В то же время, хороший учебник обязан быть максимально современным, содержать самые последние достижения в данной области науки и техники. Сочетание классического знания и суперсовременных сведений в одном издании — это сложная задача для автора. Классику описать не сложно, да и то нельзя просто переписать у предшественников. Нужно умудриться подать фундаментальные основы, хорошо известные всем специалистам в данной области, в каком-то оригинальном виде, при этом не потеряв главного — сути этих принципиальных знаний. Так, в иммунологии из учебника в учебник кочуют сведения о структуре иммуноглобулинов и генов, кодирующих эти белки, о факторах и реакциях в системе комплемента, о механизмах экстравазации лейкоцитов при воспалении и многие другие классические знания, которые не менялись в течение десятилетий, но без которых трудно представить полноценный учебник иммунологии.

Наряду с классическими, основополагающими, сведениями, учебник должен дать самые последние, самые современные достижения, открытия, факты, знания. А это совершенно иной пласт науки. Это то, что интенсивно разрабатывается и изучается в настоящее время, обсуждается на периодических встречах профессионалов (конгрессы, конференции, симпозиумы, рабочие совещания), публикуется в профессиональных научных журналах. В учебнике должны быть охвачены все значительные области иммунологии, но следить за публикацией последних достижений во всех областях очень сложно или почти невозможно. Это одна из самых трудных задач для автора учебника. Несмотря на трудность задачи, в рецензируемом издании Р.М. Хаитову успешно удалось представить как общие, классические, сведения, формирующие основы иммунологии, так и наиболее интересные и перспективные новые достижения этой науки.

Сложность понимания и представления современных знаний в учебнике для студентов

Последние годы сильно изменили биологию в целом и иммунологию в частности. Виной тому — технологическая революция, которая произошла в последние 20–25 лет и по сей день продолжается с нарастающей скоростью. Эта революция основывается на создании мощных компьютеров с огромными скоростями действия и практически неограниченными объемами памяти. Важно и то, что эти компьютеры стали доступны всем, ими можно пользоваться, выходя в сеть со своего ноутбука. В свою очередь, мощные компьютерные системы позволили создать автоматизированные системы анализа, синтеза, секвенирования, измерения концентраций тысяч веществ и многое другое, что потрясает воображение. Раньше иммунологи анализировали одну или несколько клеточных популяций, один или несколько клеточных белков (цитокины, хемокины, рецепторы и т.д.), измеряли экспрессию мРНК одного или нескольких генов. Теперь в одном анализе можно получать данные об экспрессии всех (более 20 тысяч) генов, продукции сотен белков, структуре миллионов рецепторов (TCR- и BCR-секвенирование). Современные системы и методы исследования дают гигантские массивы данных, которые невозможно анализировать как раньше. Чтобы соответствовать современному уровню, биолог (иммунолог) теперь не может ограничиться флуоресценцией одного или нескольких белков в клетке (микроскопия, цитометрия) или измерением уровня экспрессии мРНК одного или нескольких генов (РВ-ПЦР), или измерением концентрации нескольких цитокинов в биологической жидкости (иммуноферментный или иммунохемилюминесцентный анализы). Теперь метод РНК-секвенирования дает возможность оценить экспрессию мРНК сразу всех генов, а мультиплексные методы протеомики — продукцию сразу многих сотен белков. Раньше иммунолог окрашивал интересующий его белок на гистологическом срезе (иммуногистохимия), а теперь мультиплексная иммуногистофлуоресценция использует окрашивание до 50 молекулярных маркеров на одном гистологическом срезе, что позволяет типировать каждую клетку, а затем переводить эту информацию в виртуальный (компьютерный) образ, где уже нет среза, но есть вся информация о нем. Такой виртуальный гистологический срез содержит информацию о каждой клетке, ее позиции и молекулярных особенностях, о размерах и форме клеток, о количестве клеток разных типов, о контактах любых клеток друг с другом, о дистанции между клетками одного типа или клетками разных типов, о клеточных скоплениях и сообществах и т.д., и т.п. Компьютерная система может содержать подобную информацию о сотнях полей зрения на одном срезе, может сравнивать десятки и сотни разных срезов между собой. Компьютерные системы обучены реконструировать структуру ткани в объеме (виртуальные 3D-изображения), могут «крутить» это изображение в пространстве, позволяя исследователю лучше рассмотреть какие-то детали. Т. е. современные автоматизированные и компьютеризированные системы могут делать то, что никак не мог бы сделать гистолог. Возможности такого современного

анализа бесконечно большие, но его не может выполнять классический биолог, гистолог или иммунолог. Слишком велики массивы данных. Чтобы с ними работать, нужны специальные программы и специально обученные профессионалы, биоинформатики.

Как следствие описанной революции, которая привела к получению гигантских объемов сведений в каждом современном анализе, произошла радикальная трансформация научных публикаций в биологии вообще и в иммунологии в частности. Современные научные статьи уже настолько насыщены информацией, настолько сложны для понимания, что даже многим классическим иммунологам «не по зубам». Статьи изобилуют Heat map, PCA plot, TSNE plot, UMAP plot, Cluster map, Volcano plot и еще десятками других форм презентации данных. Понять, что в них содержится, слишком сложно даже зрелым профессионалам-иммунологам. А как эту самую современную информацию трансформировать в простые и понятные формы для студентов, только начинающих осваивать основы иммунологии? Это весьма непростая задача для автора учебника.

На этом самом современном уровне еще сложнее охватить все новое, что публикуется во всех значительных областях иммунологии. Исследователь может читать и знать новости в своей области науки, в которой он работает, а автор учебника должен знать все, должен успевать следить за стремительным развитием всех областей иммунологии. Это почти невыполнимая задача. Остается лишь удивляться и с большим уважением констатировать, что Р.М. Хаитову это удалось. 4-е издание учебника «Иммунология» содержит все значительные достижения иммунологии последних лет.

Не вызывает сомнений, что 4-е издание учебника «Иммунология» Р.М. Хаитова будет по достоинству оценено студентами и преподавателями медицинских и биологических вузов, а также исследователями в самых разных областях медицины и биологии. Выход в свет этого издания — это замечательное событие, которое нам и хотелось отметить, впечатлениями о котором мы делимся с читателями журнала «Иммунология».

академик РАН А.Л. Гинцбург
академик РАН А.Г. Габибов
академик РАН С.М. Деев
академик РАН В.В. Зверев
академик РАН А.Г. Румянцев

академик РАН Х.П. Тахчиди
академик РАН В.А. Ткачук
академик РАН Н.Д. Юшук
профессор Р.И. Атауллаханов

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-1β 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-1β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т.е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Акимото Н.	1367	Каргов И.С.	1347	Савченко А.А.	1319
Акулова С.С.	1333	Коган И.Ю.	1383	Саидов М.З.	1239
Белякова В.В.	1395	Корнева Е.А.	1367	Сельков С.А.	1207, 1383
Болков М.А.	1357	Корсунский И.А.	1405	Семикина Е.Л.	1333
Борисов А.Г.	1319	Кудрявцев И.В.	1319	Сенникова С.В.	1333
Бубнова Л.Н.	1307	Кузьмина В.В.	1347	Серебрякова М.К.	1319
Власова Е.В.	1357	Майорова О.А.	1395	Смердова М.А.	1395
Глазанова Т.В.	1307	Мастерова А.А.	1319	Соколов Д.И.	1207, 1383
Гребенкина П.В.	1383	Мачарадзе Д.Ш.	1271	Степанова И.Е.	1395
Гриценко О.Д.	1319	Михайлова В.А.	1207, 1383	Топтыгина А.П.	1333, 1395
Давыдова А.А.	1383	Мишина Т.Е.	1389	Труфанова А.А.	1229
Давыдова Н.В.	1389	Миямура С.	1367	Тузанкина И.А.	1357
Денисов А.А.	1347	Мудров В.П.	1389	Тышук Е.В.	1207, 1383
Дерябина С.С.	1357	Нагайцева Д.С.	1347	Филиппенко А.В.	1229
Дмитриенко Е.В.	1367	Никитина Н.В.	1357	Черевко Н.А.	1347
Дмитрук В.С.	1347	Нода М.	1367	Черемохин Д.А.	1357
Загайнова В.А.	1383	Носков А.К.	1229	Чернов А.Н.	1285
Закиров Р.Ш.	1333	Обрядина А.П.	1395	Чечеткин А.В.	1307
Иванова И.А.	1229	Омельченко Н.Д.	1229	Шамова О.В.	1285
Иванова Н.В.	1395	Орлов Д.С.	1285	Шестерня П.А.	1319
Казаков С.П.	1389	Оспельникова Т.П.	1347	Шилова Е.Р.	1307

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аллергическое заболевание	1348	сопоставление тест-систем	1396
аллоиммунизация	1308	субпопуляции лимфоцитов	1320, 1334
ангиогенез	1239	трансфузии компонентов крови	1308
антитела	1396	трансфузионно-обусловленная иммуномодуляция ...	1308
биомаркеры	1348	триптаза	1271
больные анкилозирующим спондилитом	1320	трофобласт	1384
ВОИ	1358	тучные клетки	1271
воспаление	1239	фенотип	1320, 1384
врожденные ошибки иммунитета	1358	хемокины	1239
врожденный иммунитет	1286	хроническая крапивница	1348
гранулемы	1239	цитокины	1208, 1239, 1334
диагностика COVID-19	1396	цитотоксические Т-лимфоциты	1320
дифференцировка	1208	цитотоксичность	1208
иммунологический синапс	1208	ЧМТ	1368
интерфероны	1348	эффективность	1405
капиллярная кровь	1334	8-охоG	1368
клетки памяти	1230	АТР	1368
клеточный иммунный ответ	1230	В-лимфоциты	1334
лимфоциты	1239	CATCH-22	1358
макрофаги	1239	CD56	1384
механизмы проонкогенного действия	1286	DGS	1358
механизмы противоопухолевого действия	1286	GDNF	1368
микроглия	1368	IL-15	1384
моноциты	1334, 1389	IL-18	1384
настораживающие признаки	1405	LL-37	1286
нейтрофилы	1389	MERS-CoV	1230
ожирение	1348	МНС I класса	1239
опухоль	1286	МНС II класса	1239
пародонтит	1389	MLPA	1358
пептиды семейства кателицидинов	1286	N-белок	1396
первичные иммунодефициты	1405	NGF	1368
периферическая кровь	1384	NK-клетки	1208, 1384
протегрин-1	1286	S-белок	1396
псориаз	1334	SARS-CoV	1230
ревматические болезни	1239	SARS-CoV-2	1230, 1396
регуляторные цитокины	1348	TNFα	1368
рецепторы	1208	Т-лимфоциты	1230, 1320, 1334
синдром активации тучных клеток	1271	Т-хелперы	1320
синдром делеции 22q11.2	1358	Treg-клетки	1389
синдром Ди Джорджи	1358	α-триптаземия	1271
системный мастоцитоз	1271		