

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

БСМ

ISSN 1682-0363 (print)
ISSN 1819-3684 (on-line)

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE

BSM



Том 18

№ 1. 2019

Ведущие иммунологи РАН о проблемах современной иммунологии и иммунопатологии

ВЫПУСКАЮЩИЕ РЕДАКТОРЫ



В.А. Козлов
Академик РАН



О.И. Уразова
Член-корреспондент РАН



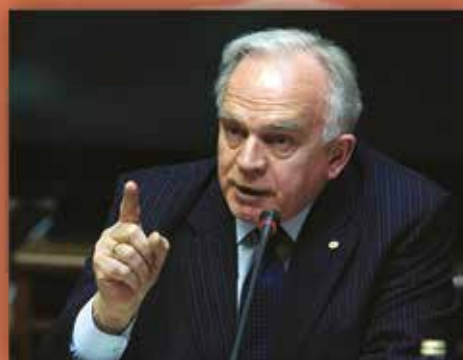
Р.М. Хаитов
Академик РАН



Р.В. Петров
Академик РАН



И.И. Долгушин
Академик РАН



В.А. Черешнев
Академик РАН

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал
Выходит 4 раза в год

ТЕМАТИЧЕСКИЙ ВЫПУСК «ИММУНОЛОГИЯ СЕГОДНЯ И ЗАВТРА»

Том 18, № 1, 2019

ISSN 1682-0363 (print)
ISSN 1819-3684 (on-line)

УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ:

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный
медицинский университет» Минздрава России

Журнал основан в 2001 году
Зарегистрирован в Министерстве РФ
по делам печати, телерадиовещания
и средств массовых коммуникаций
Свидетельство регистрации ПИ
№ 77-7366 от 26.03.2001 г.

Журнал издается при поддержке
ТРОО «Академия доказательной медицины»

Журнал входит в Перечень ведущих
рецензируемых научных журналов и изданий,
выпускаемых в РФ, в которых должны быть
опубликованы основные научные результаты
диссертаций на соискание ученой степени
доктора и кандидата наук

Индексация:
Scopus

Web of Science (WoS (ESCI))

РИНЦ (Science Index)

RSCI

Ulrich's International Periodicals Directory

Cyberleninka

DOAS

Редакция:

634050, г. Томск, пр. Ленина, 107.

Тел.: (382-2)-51-41-53.

<http://bulletin.tomsk.ru>

E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru

Оригинал-макет:

Издательство СибГМУ.

634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

Редактор Е.Е. Степанова

Корректор Ю.П. Готфрид

Перевод: М.Е. Орлова, Дж. Палацца

Электронная верстка, дизайн обложки

А.Д. Кривцова

Отпечатано в ООО «Литбюро»,
634055, г. Томск, ул. Королёва, 4.

Подписано в печать 20.03.2019 г.

Формат 60 × 84/8. Печать офсетная.

Бумага мелованная. Гарнитура «Мысль».

Печ. л. 36,75. Усл. печ. л. 36,5.

Тираж 500 экз. Заказ 53.

Цена – свободная.

Дата выхода в свет 26.03.2019.

Подписка по каталогу «Роспечать» в любом
отделении почты России, подписной индекс 46319
При перепечатке ссылка на

«Бюллетень сибирской медицины» обязательна

Ответственность за достоверность информации,
содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

© Сибирский государственный медицинский университет, 2019

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

В.В. Новицкий, академик РАН (Томск)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

А.М. Огородова, член-корреспондент РАН (Томск)

О.И. Уразова, член-корреспондент РАН (Томск)

ВЫПУСКАЮЩИЕ РЕДАКТОРЫ:

В.В. Козлов, академик РАН (Новосибирск)

О.И. Уразова, член-корреспондент РАН (Томск)

РЕДКОЛЛЕГИЯ:

В.М. Алифирова, профессор, д-р мед. наук (Томск)

А.И. Афтанас, академик РАН (Новосибирск)

А.Н. Байков, профессор, д-р мед. наук (Томск)

А.А. Баранов, академик РАН (Москва)

А.И. Венгеровский, профессор, д-р мед. наук (Томск)

Е.Г. Григорьев, член-корреспондент РАН (Иркутск)

А.М. Дыгай, академик РАН (Томск)

М.В. Завьялова, профессор, д-р мед. наук (Томск)

А.В. Капилевич, профессор, д-р мед. наук (Томск)

С.И. Карась, профессор, д-р мед. наук (Томск)

Р.С. Карпов, академик РАН (Томск)

В.И. Киселев, член-корреспондент РАН (Барнаул)

Н.А. Корнетов, профессор, д-р мед. наук (Томск)

С.В. Логвинов, профессор, д-р мед. наук (Томск)

А.Д. Макацария, член-корреспондент РАН (Москва)

А.С. Намазова-Баранова, академик РАН (Москва)

С.А. Некрылов, профессор, д-р ист. наук (Томск)

В.П. Пузырев, академик РАН (Томск)

В.Ю. Серебров, профессор, д-р мед. наук (Томск)

В.И. Стародубов, академик РАН (Москва)

Е.А. Степовая, профессор, д-р мед. наук (Томск)

А.Т. Тепляков, профессор, д-р мед. наук (Томск)

В.А. Ткачук, академик РАН (Москва)

В.А. Труфакин, академик РАН (Новосибирск)

О.С. Федорова, профессор, д-р мед. наук (Томск)

И.А. Хлусов, профессор, д-р мед. наук (Томск)

Е.Л. Чойнзонов, академик РАН (Томск)

А.Г. Чучалин, академик РАН (Москва)

А.В. Шабров, академик РАН (Санкт-Петербург)

В.А. Шкурупий, академик РАН (Новосибирск)

М.С. Юсубов, профессор, д-р хим. наук (Томск)

A. Antsaklis, профессор (Греция)

F. Chervenak, профессор (США)

C. Dadak, профессор (Австрия)

Y. Dekhtyar, профессор (Латвия)

M. Epple, профессор (Германия)

D. Gailani, профессор (США)

P. Odermatt (Швейцария)

J. Odland (Норвегия)

S. Orlov, профессор (Канада)

M. Poyurovsky, профессор (Израиль)

V. Zhdankin, профессор (США)

BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE

Peer-reviewed scientific-practical journal
Issued quarterly

SPECIAL ISSUE "TRENDS IN IMMUNOLOGY: TODAY AND TOMORROW"

Volume 18, No. 1, 2019

ISSN 1682-0363 (print)
ISSN 1819-3684 (on-line)

FOUNDER AND PUBLISHER:

Siberian State Medical University, the Ministry
for Healthcare of the Russian Federation

Registered by the Ministry of the Russian Federation
for Affairs of the Press, Television and Radio
Broadcasting and Mass Communication Media
Certificate of registration PI No. 77-7366
dated to 26.03.2001

The journal is published and supported
by Tomsk Regional Organization «Academy
of Evidence-based Medicine»

Bulletin of Siberian Medicine is included:
in the List of peer-reviewed scientific journals
and publications issued in the Russian Federation,
which should publish main scientific results
of doctor's and candidate's theses

Bulletin of Siberian Medicine is indexed:
Scopus
Web of Science (WoS (ESCI))
Science Index
RSCI
Ulrich's International Periodicals Directory
Cyberleninka
DOAS

Editorial Board Office:
107, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation
Telephone: +7-(382-2)-51-41-53.
<http://bulletin.tomsk.ru>
E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru

Publisher: the Siberian State Medical University.
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050,
Russian Federation.
Editor E.E. Stepanova
Proofreader Yu.P. Gotfrid
Translate: M.E. Orlova, D. Palazza
Electronic makeup, cover design
L.D. Krivtsova

Printed in Litbuo LLC,
4, Korolev Str., Tomsk, 634055, Russian Federation

Signed to print 20.03.2019
Format 60 × 84/8. Offset print.
Coated paper. Mysl' font.
P.l. 36,75. C.p.l. 36,5.
500 copies. Odder no. 53.

The price – free.
Date of publication 26.03.2019.

Pass-through copyright.
Advertising providers are liable for the truthfulness
of information in advertising materials.

© Siberian State Medical University, 2019

EDITOR-IN-CHIEF

V.V. Novitskiy, *Academician of RAS (Tomsk)*

DEPUTY-EDITORS-IN-CHIEF:

L.M. Ogorodova, *Corresponding Member of RAS (Tomsk)*

O.I. Urazova, *Corresponding Member of RAS (Tomsk)*

EDITORS OF SPECIAL ISSUE:

V.A. Kozlov, *Academician of RAS (Novosibirsk)*

O.I. Urazova, *Corresponding Member of RAS (Tomsk)*

EDITORIAL BOARD:

V.M. Alifirova, *Professor (Tomsk)*

L.I. Aftanas, *Academician of RAS (Novosibirsk)*

A.N. Baikov, *Professor (Tomsk)*

A.A. Baranov, *Academician of RAS (Moscow)*

A.I. Vengerovsky, *Professor (Tomsk)*

Ye.G. Grigoriyev, *Corresponding Member of RAS (Irkutsk)*

A.M. Dygai, *Academician of RAS (Tomsk)*

M.V. Zav'yalova, *Professor (Tomsk)*

L.V. Kapilevich, *Professor (Tomsk)*

S.I. Karas, *Professor (Tomsk)*

R.S. Karpov, *Academician of RAS (Tomsk)*

V.I. Kiselyov, *Corresponding Member of RAS (Barnaul)*

A.N. Kornetov, *Professor (Tomsk)*

S.V. Logvinov, *Professor (Tomsk)*

A.D. Makatsaria, *Corresponding Member of RAS (Moscow)*

L.S. Namazova-Baranova, *Academician of RAS (Moscow)*

S.A. Nekrylov, *Professor (Tomsk)*

V.P. Puzyryov, *Academician of RAS (Tomsk)*

V.Yu. Serebrov, *Professor (Tomsk)*

V.I. Starodubov, *Academician of RAS (Moscow)*

Ye.A. Stepovaya, *Professor (Tomsk)*

A.T. Teplyakov, *Professor (Tomsk)*

V.A. Tkachuk, *Academician of RAS (Moscow)*

V.A. Trufakin, *Academician of RAS (Novosibirsk)*

O.S. Fedorova, *Professor (Tomsk)*

I.A. Khilusov, *Professor (Tomsk)*

Ye.L. Choinzonov, *Academician of RAS (Tomsk)*

A.G. Chuchalin, *Academician of RAS (Moscow)*

A.V. Shabrov, *Academician of RAS (St. Petersburg)*

V.A. Shkurupiy, *Academician of RAS (Novosibirsk)*

M.S. Yusubov, *Professor (Tomsk)*

A. Antsaklis, *Professor (Greece)*

F. Chervenak, *Professor (USA)*

C. Dadak, *Professor (Austria)*

Y. Dekhtyar, *Professor (Latvia)*

M. Epple, *Professor (Germany)*

D. Gailani, *Professor (USA)*

P. Odermatt (Switzerland)

J. Odland (Norway)

S. Orlov, *Professor (Canada)*

M. Poyurovsky, *Professor (Israel)*

V. Zhdankin, *Professor (USA)*

ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ	REVIEWS AND LECTURES
<i>Козлов В.А.</i> Иммунная парадигма и иммуносупрессорная доминанта в патогенезе основных заболеваний современного человека <i>Григорьев Е.В., Матвеева В.Г., Шукевич Д.А., Радивилко А.С., Великанова Е.А., Ханова М.Ю.</i> Индукцированная иммуносупрессия в критических состояниях: диагностические возможности в клинической практике <i>Долгушин И.И.</i> Нейтрофильные гранулоциты: новые лица старых знакомых <i>Друцкая М.С., Губернаторова Е.О., Горшкова Е.А., Ахметханов К.С.Н., Носенко М.А., Гоголева В.С., Намаканова О.А., Зварцев Р.В., Круглов А.А., Недоспасов С.А.</i> Цитокины, обратная генетика и антицитокиновая терапия <i>Жернов Ю.В., Хаитов М.Р.</i> Микробициды для топической иммунопрофилактики ВИЧ-инфекции <i>Патышева М.Р., Стахеева М.Н., Ларионова И.В., Тарабановская Н.А., Григорьева Е.С., Слонимская Е.М., Кзышкowska Ю.Г., Чердынцева Н.В.</i> Моноциты при злокачественных новообразованиях: перспективы и точки приложения для диагностики и терапии <i>Свиридова В.С., Исаев П.Ю., Климов В.В., Романова М.И., Кошкарлова Н.С.</i> Аллерген-ассоциированные молекулярные паттерны: новое слово в современной аллергологии <i>Симбирцев А.С.</i> Имунофармакологические аспекты системы цитокинов <i>Суплотова Л.А., Макарова О.Б., Ковальжина Л.С., Шафуха Г.В.</i> Оценка индикаторов медико-биологического мониторинга йододефицитных заболеваний <i>Фрейдлин И.С., Старикова Э.А., Лебедева А.М.</i> Преодоление защитных функций макрофагов факторами вирулентности <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Гудима Г.О., Кofiади И.А.</i> Аллельные варианты генов человека, затрагивающие внутриклеточный жизненный цикл ВИЧ и регулирующие иммунный ответ на ВИЧ-инфекцию	<i>Kozlov V.A.</i> Immune paradigm and immunosuppressive dominance in the pathogenesis of major diseases of modern man <i>Grigoryev E.V., Matveeva V.G., Shukevich D.L., Radivilko A.S., Velikanova E.A., Khanova M.Yu.</i> Induced immunosuppression in critical care: diagnostic opportunities in clinical practice <i>Dolgushin I.I.</i> Neutrophil granulocytes: new faces of old acquaintances <i>Drutskaya M.S., Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Athertkbany K.-S.N., Nosenko M.A., Gogoleva V.S., Namakanova O.A., Zvartsev R.V., Kruglov A.A., Nedospasov S.A.</i> Cytokines, reverse genetics and anti-cytokine therapy <i>Zhernov Yu.V., Khaitov M.R.</i> Microbicides for topical immunoprevention of HIV infection <i>Patysheva M.R., Stakheeva M.N., Larionova I.V., Tarabanovskaya N.A., Grigorieva E.S., Slonimskaya E.M., Kzbyshkowska J.G., Cherdyntseva N.V.</i> Monocytes and cancer: promising role as diagnostic marker and target for the therapy <i>Sviridova V.S., Isaev P.Yu., Klimov V.V., Romanova M.I., Kosbkarova N.S.</i> Allergen-associated molecular patterns: a new trend in modern allergology <i>Simbirtsev A.S.</i> Immunopharmacological aspects of the cytokine system <i>Suplotova L.A., Makarova O.B., Kovalzhina L.S., Sharubo G.V.</i> Assessment of indicators of medical and biological monitoring of iodine deficiency diseases <i>Freydlin I.S., Starikova E.A., Lebedeva A.M.</i> Overcoming the protective functions of macrophages by <i>Streptococcus pyogenes</i> virulence factors <i>Khaitov R.M., Alexeev L.P., Gudima G.O., Kofiadi I.A.</i> Allelic variants of human genes affecting HIV intracellular life cycle and regulating immune response to HIV infection

Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Гудима Г.О., Кофиади И.А. Генетические факторы, влияющие на проникновение ВИЧ в клетку-мишень	131	<i>Khaitov R.M., Alexeev L.P., Gudima G.O., Kofiadi I.A.</i> Genetic factors influencing HIV entry into target cells
Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Уразова О.И., Чумакова С.П., Винс М.В., Береснева А.Е., Новицкий В.В. Макрофаги при бактериальных болезнях легких: фено- тип и функции (обзор)	142	<i>Churina E.G., Sitnikova A.V., Urazova O.I., Chumakova S.P., Vins M.V., Beresneva A.E., Novitskiy V.V.</i> Macrophages in bacterial lung diseases: phenotype and functions (review)
ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ		ORIGINAL ARTICLES
Абрамова Т.Я., Цура В.А., Блинова Е.А., Моренкова А.Ю., Чумасова О.А., Сулутьян А.Э., Сизиков А.Э., Козлов В.А. Индукция апоптоза лимфоцитов здоровых людей и па- циентов с ревматоидным артритом в условиях «клеточ- ного соседства» <i>in vitro</i>	155	<i>Abramova T.Ya., Tsura V.A., Blinova E.A., Morenkova A.Yu., Chumasova O.A., Sulutian A.E., Sizikov A.E., Kozlov V.A.</i> Induction of lymphocyte apoptosis in healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis under cellular neighborhood <i>in vitro</i>
Барковская М.Ш., Блинова Е.А., Коняхина Ю.В., Леонова М.И., Непомнящих В.М., Демина Д.В., Кожевников В.С., Козлов В.А. Распределение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при бронхиальной астме	164	<i>Barkovskaya M.Sh., Blinova E.A., Konyabina J.V., Leonova M.I., Nepomniashchikh V.M., Demina D.V., Kozhevnikov V.S., Kozlov V.A.</i> Telomere length distribution on individual chromosome arms in patients with bronchial asthma
Газатова Н.Д., Юрова К.А., Гаврилов Д.В., Вульф М.А., Новицкий В.В., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С. Особенности клеточного иммунитета и регенерации при алкогольном фиброзе печени	175	<i>Gazatova N.D., Yurova K.A., Gavrilov D.V., Vulf M.A., Novitskiy V.V., Todosenko N.M., Litvinova L.S.</i> Features of cellular immunity and regeneration for alcoholic fibrosis of the liver
Голубинская Е.П., Филоненко Т.Г., Кубышкин А.В., Ермола Ю.А., Кальфа М.А., Геращенко А.В., Крамарь Т.В. Иммунофенотип макрофагальной популяции при фи- брозно-кавернозном туберкулезе легких	190	<i>Golubinskaya E.P., Filonenko T.G., Kubysbkin A.V., Yermola Yu.A., Kalfa M.A., Gerashchenko A.V., Kramar T.V.</i> Immunophenotype of the macrophage population in fibrous, cavernous pulmonary tuberculosis
Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Свитич О.А., Брагвадзе Б.Г., Алексеева А.А., Ганковская Л.В. Роль эпителиальных клеток в патогенезе атопии	201	<i>Kazimirsky A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Svitich O.A., Bragvadze B.G., Alekseeva A.A., Gankovskaya L.V.</i> The role of epithelial cells in atopy pathogenesis
Колобовникова Ю.В., Янкович К.И., Романова Е.В., Дмитриева А.И., Уразова О.И., Новицкий В.В., Полетика В.С. VEGF- и EGF-опосредованная кооперация эозино- фильных гранулоцитов и опухолевых клеток при раке желудка и толстого кишечника	211	<i>Kolobovnikova Yu.V., Yankovich K.I., Romanova E.V., Dmitrieva A.I., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Poletika V.S.</i> VEGF-and EGF-mediated cooperation of eosinophilic granulocytes and tumor cells in gastric and colon cancer

Красногорова Н.В., Новиков Д.В., Фомина С.Г., Алясова А.В., Магомедов М.А., Новиков В.В., Караулов А.В. Уровень мРНК CD16A и CD16B как потенциальный им- мунологический маркер при колоректальном раке	220	Krasnogorova N.V., Novikov D.V., Fomina S.G., Alyasova A.V., Magomedov M.A., Novikov V.V., Karaulov A.V. The CD16A and CD16B mRNA level as potential immunological marker in colorectal cancer
Хаитов Р.М., Никонова А.А., Хаитов М.Р. Моноциты, β -лимфоциты и дендритные клетки при риновирус-индуцированном обострении бронхиальной астмы	228	Khaitov R.M., Nikonova A.A., Khaitov M.R. Monocytes, B-cells and dendritic cells during rhinovirus-induced asthma exacerbation
Храмцова Ю.С., Арташян О.С., Тюменцева Н.В., Юшков Б.Г., Бухарина А.Ю. Тучные клетки и сперматогенез в норме и при повреж- дении	237	Kbramtsova Yu.S., Artashyan O.S., Tyumentseva N.V., Yushkov B.G., Bukharina A.Yu. Interrelation of mast cells with spermatogenesis in norm and in case of damage
Черешнев В.А., Сайдакова Е.В., Королевская Л.Б., Шмагель Н.Г., Шмагель К.В. Субпопуляционный состав регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов с ВИЧ-инфекцией при эффективной анти- ретровирусной терапии	247	Chereshevnev V.A., Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Shmagel N.G., Shmagel K.V. Regulatory T-lymphocyte subsets in patients with HIV infection receiving highly active antiretroviral therapy
Черных В.В., Коненков В.И., Ермакова О.В., Орлов Н.Б., Обухова О.О., Еремина А.В., Трунов А.Н. Содержание цитокинов и факторов роста во внутри- глазной жидкости у пациентов с первичной открыто- угольной глаукомой	257	Chernykh V.V., Konenkov V.I., Ermakova O.V., Orlov N.B., Obukhova O.O., Eremina A.V., Trunov A.N. Content of cytokines and growth factors in the intraocular fluid of patients with primary open-angle glaucoma
Черных Е.Р., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Сахно Л.В., Останин А.А. Фенотип и функции дендритных клеток человека, генери- рованных из субпопуляций моноцитов CD14+, оппози- тных по экспрессии CD16	266	Chernykh E.R., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Kurochkina Yu.D., Oleynik E.A., Sakbno L.V., Ostanin A.A. Phenotype and functions of human dendritic cells derived from CD14+ monocyte subsets opposed to CD16 expression
Чумакова С.П., Винс М.В., Уразова О.И., Азарова Д.А., Шипулин В.М., Пряхин А.С., Букреева Е.Б., Буланова А.А., Кошель А.П., Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Гарганеева Н.П., Новицкий В.В. Субпопуляции моноцитов крови у больных с генерали- зованной гипоксией	277	Chumakova S.P., Vins M.V., Urazova O.I., Azarova D.A., Shipulin V.M., Pryakhin A.S., Bukreeva E.B., Bulanova A. A., Kosbel A.P., Churina E.G., Sitnikova A.V., Garganeeva N.P., Novitskiy V.V. Subpopulations of blood monocytes in patients with generalized hypoxia
Шевырев Д.В., Блинова Е.А., Козлов В.А. Влияние гуморальных факторов гомеостатической про- лиферации на Т-регуляторные клетки <i>in vitro</i>	286	Shevyrev D.V., Blinova E.A., Kozlov V.A. The influence of humoral factors of homeostatic proliferation on T-regulatory cells <i>in vitro</i>

ДОРОГИЕ КОЛЛЕГИ!

Я обращаюсь к каждому, кто найдет в этом журнале что-то интересное для себя, нужное и даже необходимое для своих представлений об иммунологии, ее значимости для клиники!

Этот номер необычен для нашего времени по двум причинам. Во-первых, он посвящен науке – основополагающей из всех медико-биологических дисциплин, ибо только иммунология имеет в своих руках важнейшие знания о патогенезе основных заболеваний современного человека и их лечении методами иммунотерапии. Но это не главное. Журналов по данной научной проблеме издается огромное количество. Во-вторых, и это, на мой взгляд, крайне важно, авторами статей в данном номере являются члены Российской академии наук, имеющие прямое отношение к иммунологии, которой они посвятили свою жизнь в науке. Возможно, это первый журнальный номер подобного рода за всю историю нашего Отечества. Может быть?! Наверное, так! Думаю, что так!

Иммунология – замечательная, великая наука. Кто-нибудь сможет когда-нибудь подсчитать, сколько сотен миллионов, а может быть, уже миллиардов жизней на нашей планете спасла эта наука в течение последних каких-нибудь 130 лет после появления первой профилактической вакцины? А скольким миллионам она сохранила жизнь после первого, научно обоснованного переливания одногруппной крови? Возможно, на Земле живут уже несколько сотен тысяч пациентов с пересаженными чужими органами и тканями. И это все она, наука с большой буквы – Иммунология, где фундаментальные и клинические исследования идут нога в ногу, как ни в одной другой медико-биологической науке, имеющей отношение к здоровью человека. Именно иммунология решила все эти проблемы. И если не решила их полностью, то четко обозначила направления, по которым надо идти до их окончательного решения.

А аутоиммунные и аллергические заболевания? А рак и атеросклероз? А беременность и болезни раннего детского возраста? Старение,

наконец? То, что важнейшими звеньями патогенеза этих состояний являются нарушения нормального функционирования иммунной системы, уже не надо никому доказывать. Необходимо только «дорабатывать» детали, хотя их много, очень много. Но надо обязательно! Можно сказать, что XX в. был веком иммунологии. Первая его половина ознаменовалась появлением вакцин и учением о группах крови; во второй половине были сделаны важнейшие открытия в области трансплантологии и патогенеза основных заболеваний современного человека. По-видимому, XXI станет веком патогенетически обоснованной иммунотерапии, которая развивается по двум направлениям, теснейшим образом связанных между собой. Речь идет о молекулярной и клеточной иммунотерапии.

Не все задуманное удалось реализовать с изданием данного номера. Тем не менее в каждой статье участвуют члены РАН, либо являющиеся иммунологами по специальности, либо их работы тесно связаны с решением проблем в области иммунологии. Может быть, это только начало, и через год-другой начнут ежегодно выходить журналы, где авторами будут иммунологи – члены РАН, которые будут представлять свое видение иммунологических проблем, а значит, и проблем современной медицины в целом. Будет очень и очень здорово, если это случится.

Завершая краткое предисловие к этому номеру журнала, позволю себе заключить его словами великого Пастера, слегка перефразировав их: наука «Иммунология» должна быть возвышенным воплощением Отечества, ибо из всех народов первым будет всегда тот, который опередит другие в области мысли о фундаментальной иммунологии и умственной деятельности в клинической иммунологии.

**Академик РАН
по специальности «иммунология»,
вице-президент Российского
научного общества иммунологов
В.А. Козлов**

УДК 616.1/.9-092:612.017
[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-7-17](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-7-17)

Иммунная парадигма и иммуносупрессорная доминанта в патогенезе основных заболеваний современного человека

Козлов В.А.

*Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14*

РЕЗЮМЕ

В статье обсуждается определяющая роль иммунопатогенеза основных заболеваний современного человека (рак, атеросклероз, аутоиммунные, аллергические и инфекционные заболевания). В этом отношении вводится понятие «иммунная парадигма». Представлены доказательства, что любая патология связана с классическим иммунным ответом к антигену, будь то ауто- или ксеноантиген, со всеми стадиями его развития и параллельным изменением состояния иммунной толерантности: ее «полома» (в случаях аутоиммунных и аллергических заболеваний и атеросклероза) и установления (при онкологических и инфекционных заболеваниях). Вместе с тем подчеркивается, что в основе иммунопатогенеза лежит недостаточная или повышенная функция иммунокомпетентных регуляторных клеток с супрессорной активностью. Вводится понятие «иммуносупрессорная доминанта». Обсуждается необходимость принципиальных изменений в терапии указанных заболеваний, где ведущее место должны занять молекулярные и клеточные методы иммунотерапии с разработкой комплексных подходов к их применению.

Ключевые слова: иммунопатогенез, рак, аллергия, инфекция, атеросклероз, регуляторные клетки-супрессоры, молекулярная и клеточная иммунотерапия.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Козлов В.А. Иммунная парадигма и иммуносупрессорная доминанта в патогенезе основных заболеваний современного человека. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 7–17. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-7-17](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-7-17).

УДК 616.1/.9-092:612.017
[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-7-17](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-7-17)

Immune paradigm and immunosuppressive dominance in the pathogenesis of major diseases of the modern man

Kozlov V.A.

*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation*

✉ Козлов Владимир Александрович, e-mail: vakoz40@yandex.ru.

ABSTRACT

The article discusses the determining role of immunopathogenesis of the main diseases of the modern man (cancer, atherosclerosis, autoimmune, allergic and infectious diseases). In this regard, the concept of «immune paradigm» is introduced. There is evidence that any pathology is based on the classical immune response to the antigen, whether auto- or xenoantigen, with all stages of its development and parallel changes in the state of immune tolerance: its breakdown in cases of autoimmune and allergic diseases and atherosclerosis; its establishment in cases of cancer and infectious diseases. In the meantime, it is emphasized that the immunopathogenesis is based on insufficient or increased function of immunocompetent regulatory cells with suppressive activity. Here the concept of «immunosuppressive dominant» is introduced. Finally, we discuss the need for fundamental changes in treatment of these diseases, with a focus on molecular and cellular immunotherapy methods and development of integrated approaches to their application.

Key words: immunopathogenesis, cancer, allergic, infection, atherosclerosis, immunoregulatory suppressor cells, methods of molecular and cellular immunotherapy.

Conflict of interest. The author declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The author states that no funding has been received for the study.

For citation: Kozlov V.A. Immune paradigm and immunosuppressive dominance in the pathogenesis of major diseases of modern man. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 7–17. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-7-17>.

ВВЕДЕНИЕ

Прошло уже более 100 лет с момента проведения первой вакцинации для индукции полноценного иммунного ответа и защиты макроорганизма от инфекции. Существовало предположение, что иммунитет основан на реакции организма на бактериальный антиген. Далее была доказана роль иммунной системы в реакции на антиген и создании иммунитета к инфекционному агенту. Но главное значение имеет антиген, на который иммунная система реагирует формированием либо антител (есть антиген – образуется антитело), либо цитотоксических лимфоцитов.

Речь идет об иммунитете на основе классического иммунного ответа с фазами его развития, с участием всех популяций клеток иммунной системы, включая клетки-эффекторы и регуляторные клетки. Позднее пришло понимание первичного и вторичного иммунного ответа, иммунной памяти, дозы антигена и путей его введения в организм. Здесь все было относительно ясно: антиген-индуцированный иммунный ответ, который защищает макроорганизм от инфекции (как в случае профилактической вакцинации).

За последние 60–70 лет накопилось огромное число данных об иммунопатогенезе основных заболеваний человека, таких как аутоиммунные и аллергические заболевания, атеросклероз и, наконец, онкология. Было неоспоримо доказано

участие иммунной системы в механизмах развития данных видов патологии. Однако во всех этих исследованиях оказалось размытым понятие о классическом иммунном ответе с его понятийными характеристиками. Изучалась и изучается роль отдельных клеточных популяций иммунокомпетентных клеток, различных иммунорегуляторных молекул в развитии заболеваний и нарушений иммунитета, имеющих отношение к патологии. Но при этом результаты исследований не сопоставлялись с вкладом антигена (антигенов) в обнаруженные изменения активности клеток иммунной системы.

АУТОИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Нет особой необходимости говорить о распространенности в мире аутоиммунных заболеваний, которыми болеют несколько сотен миллионов человек. Только в США таких больных более 20 млн. Среди всех соматических патологий человека аутоиммунные заболевания были, пожалуй, первыми, патогенез которых, как установлено, связан с нарушениями в системе иммунного гомеостаза. По мере накопления знаний возрастало и количество известных антигенов, индуцирующих развитие заболевания, в том числе аутоантигенов, на которые иммунная система формирует иммунный ответ со всеми негативными для макроорганизма последствиями. В роли аутоантигенов выступают β -клетки поджелудочной железы,

коллаген 2-го типа, цитруллиновые белки, топоизомераза 1, $\beta(2)$ -гликопротеин, dsДНК и многие клеточные и субклеточные субстанции различных органов и тканей.

С точки зрения иммунопатогенеза, аутоиммунные заболевания следует рассматривать, используя два положения из современной иммунологии. С одной стороны, наличие у больных с аутоиммунной патологией достаточно большого разнообразия аутоантител, активации эффекторной функции цитотоксических лимфоцитов и клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины, свидетельствует об увеличении активности Т-хелперов: Th1, Th2, Th17. С другой стороны, все это указывает на недостаточную функциональную активность классических клеток-супрессоров (Treg, клетки-супрессоры миелоидного происхождения), а также субпопуляций клеток, которые временно в зависимости от сложившихся условий внутри иммунной системы приобретают иммуносупрессивные свойства (макрофаги, дендритные клетки, мезенхимальные стволовые клетки и др.). Что касается ревматоидного полиартрита, течение заболевания протекает на фоне повышенной активности клеток Th1, которая выражается в повышенной продукции провоспалительных молекул (интерлейкина (IL) 1, IL-6, фактора некроза опухоли α (TNF α), простагландина E2, интерферона γ (IFN γ)). Именно IFN γ отвечает за индукцию супрессорных молекул воспалительной направленности, таких как неоптерин (продукт метаболизма GTP-cyclohydrolase-1) и indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Иммуносупрессивный эффект IDO реализуется путем снижения уровня внеклеточного триптофана, необходимого для пролиферации клеток, включая лимфоциты, а также за счет продуктов катаболизма триптофана (кинуренина и др.) [1].

Необходимо подчеркнуть, что повышенная активность популяции клеток Th1 сочетается с дефицитом количества и качества функционирования иммунокомпетентных клеток-супрессоров самого различного генеза. Показано, что количество CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}/– Treg снижено у больных ревматоидным артритом (РА) [2]. В норме у здоровых доноров их количество определяется как 1–5% от общего числа CD4⁺ Т-клеток в периферической крови. Считается, что одним из механизмов снижения активности Treg при РА является негативное действие на них TNF α , играющего важнейшую роль в патогенезе данного заболевания. Эти данные подтверждаются увеличением уровня Treg у больных РА после проведе-

ния терапии антителами к данному цитокину [3]. Кроме того, у этих же больных регистрируется снижение уровня IL-35, оказывающего стимулирующее влияние на активность Treg [4].

Несомненно участие в аутоиммунных процессах регуляторных В-клеток, или Breg [5]. Основопологающие доказательства базируются на экспериментальных данных. Достаточно многочисленные исследования свидетельствуют о патогенетической роли Breg в развитии аутоиммунной патологии у мышей. Показано, что любой способ уменьшения содержания этих клеток в эксперименте приводит к ускорению развития у мышей целого ряда заболеваний, включая энцефаломиелит, ревматоидный полиартрит, системную красную волчанку и др. И в то же время введение мышам с аутоиммунными патологиями клеток Breg в достаточном количестве обуславливает явный терапевтический эффект. Главный иммуносупрессивный механизм Breg основан на их способности продуцировать IL-10 [5, 6].

Несмотря на сведения об увеличении содержания в периферической крови Breg при различных видах аутоиммунной патологии, некоторые данные литературы свидетельствуют о снижении супрессорной функции этих клеток, их чувствительности к стимулирующим эффектам со стороны Т-клеток [7].

В последнее время широко обсуждается проблема иммуносупрессивной активности мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Изучены супрессивные механизмы этих клеток, которые включают в себя подавление пролиферации Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток, угнетение дифференцировки дендритных клеток, секреции целого ряда цитокинов [8, 9]. Описаны терапевтические эффекты МСК, вводимых больным животным с аутоиммунной патологией, в основе которой лежит иммуносупрессивная активность этих клеток [10]. Но в то же время имеются данные, свидетельствующие о снижении супрессорной активности МСК при аутоиммунных заболеваниях. Это было описано для РА в эксперименте, где TNF α выступает в роли ингибитора супрессорной активности МСК и стимулятора их миграции в полость суставов с развитием воспаления. Проведение анти-TNF- α иммунотерапии нормализовало нарушенные функции МСК [11, 12]. Одним из механизмов снижения супрессорной активности МСК является подавление в них экспрессии Jagged-1 (лиганда для Notch рецептора на Т-клетках), индуцированное лигандами для рецепторов TLR3 и TLR4. Сниженная способность МСК подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов описана

у больных с апластической анемией, иммунной тромбоцитопенической пурпурой и миелодиспластическим синдромом [13–15].

АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Аллергия является типовым патологическим процессом, который характеризуется сверхчувствительностью иммунной системы организма на антиген (аллерген) при повторном его воздействии. Что такое аллерген с точки зрения иммунологии? Несомненно, это тот же самый антиген со своими особыми, специфическими характеристиками, на который, как и положено, организм отвечает продукцией специфических антител или развитием реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). В мире каждый 3–5-й человек имеет тот или иной вид аллергических реакций. Это очень много. И если при инфекции синтез антител против микробных антигенов спасает организм от заболевания, то при аллергии синтез антител против аллергена обуславливает развитие болезни. И еще, почему из двух человек, живущих в одних и тех же условиях, один становится аллергиком, а второй остается здоровым? В настоящее время имеются основания утверждать, что главным условием возможности развития аллергической патологии является снижение супрессорной активности регуляторных Т-клеток, что приводит к продукции аллергенного иммуноглобулина (Ig) E [16].

Учитывая часто регистрируемый дисбактериоз при аллергопатологии, следует принять во внимание участие кишечника в процессе формирования популяции индуцированных Treg (iTreg). Бактерии-симбионты, особенно *Clostridia strains*, принимают активное участие в индукции iTreg в кишечнике. Показано, что короткоцепочечные жирные кислоты, продукты бактериальной ферментации пищевых волокон, продуцированные различными бактериями, способствуют накоплению iTreg с участием трансформирующего фактора роста β (TGF β), из которых butyrate ингибирует гистоновую деацетилазу и повышает ацетиляцию гистона H3 в промоторе и области CNS локуса Foxp3, способствуя индуцированию iTreg. Помимо бактерий в процессе накопления iTreg в кишечнике непосредственное участие принимают CD103+ Δ K в *lamina propria*, продуцирующие и TGF β , и метаболит витамина A (retinoic acid) [17], снижение секреции которых у аллергических больных будет вносить весомый вклад в гипои́мносупрессивное состояние при данной патологии.

В качестве одного из факторов, поддерживающих воспалительный процесс при бронхиальной

астме, могут выступать эритроциты. При астме в эритроцитах обнаружены качественные и количественные изменения протеинов их мембраны. Показано, что отсутствие протеина полосы 4.2 может индуцировать повреждение целостности мембраны эритроцитов, а присутствие галектина-3 – вести к активации воспалительных клеток [18].

Литературные сведения позволяют сделать заключение общего характера об аллергопатологии как об иммунном ответе с наличием нарушений в механизмах его регуляции. Здесь имеется антиген (аллерген), который индуцирует, например, гуморальный иммунный ответ с участием антигенпрезентирующих клеток. При этом индукция ответа завершается продукцией антител. Естественно, в процессе формирования ответа принимают участие все основные и вспомогательные клетки: Th1, Th2, Th17, Treg и др. Однако главное отличие гиперергического ответа заключается в том, что организм не должен отвечать на антиген (аллерген) гиперпродукцией IgE, а он отвечает. Почему только у больного? По крайней мере, на данном этапе знаний можно говорить о ведущей причине этого состоявшегося ответа, которая заключается в ослаблении иммуносупрессорной активности регуляторных клеток, в частности Treg. Они есть, они участвуют в формировании ответа, но их активности недостаточно, чтобы оказать ингибирующее влияние на процесс образования антителообразующих клеток, продуцирующих IgE.

АТЕРОСКЛЕРОЗ

В настоящее время принято считать, что атеросклероз индуцируется хроническим воспалительным процессом в пределах стенки артериальных сосудов в ответ на эндогенные, модифицированные антигенные структуры, в частности на окисленные липопротеины низкой плотности (ЛПНП), которые стимулируют как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ. Сначала стартуют механизмы врожденного иммунитета, и после активации моноцитов и макрофагов подключается адаптивный иммунитет с презентацией антигена антигенпрезентирующими клетками эффекторному Т-лимфоциту. Предпочтение при этом отдается Th1-ответу с повышением продукции провоспалительных цитокинов IFN γ , IL-12, IL-18. Особая роль принадлежит IFN γ с его стимулирующим влиянием на активность моноцитов, макрофагов, дендритных клеток и ингибирующим эффектом на пролиферацию гладкомышечных клеток в стенках сосудов и продукцию коллагена, в сочетании с активацией металлопротеиназ

с последующим утончением фиброзных образований в стенке сосудов [19].

Атеросклероз, с точки зрения иммунопатогенеза, можно рассматривать как вариант аутоиммунной патологии. Почему? Дело в том, что при данной патологии, как и при аутоиммунных заболеваниях, иммунная система работает против собственных, сосудистых аутоантигенов, модифицированных гиперхолестеремией [20]. В качестве аутоантигенов при атеросклерозе могут выступать окисленные ЛПНП, белки теплового шока (HSP60), ангиотензин-конвертирующий фермент [21].

Что касается роли регуляторных клеток в иммунопатогенезе атеросклероза, то показано, что делеция Treg обуславливает ускоренное развитие атеросклероза, а введение этих клеток подавляет данный процесс [22]. Подобного рода результаты на мышах получены и с другими субпопуляциями регуляторных клеток Th3 (продуцируют TGF β) и Tr1 (продуцируют IL-10). Во всех ситуациях, когда нейтрализуются эффекты данных супрессорных цитокинов (введение нейтрализующих антител или растворимых рецепторов, генетические дефекты), регистрировалось ускоренное развитие атеросклероза на фоне инфильтрации активированными Т-лимфоцитами участков сосудистой альтерации. Наряду с этим отмечалось снижение содержания коллагена, увеличение продукции провоспалительных цитокинов при изменении активности иммунной системы в сторону Th1-клеток. Воздействия, связанные с повышением продукции TGF β и IL-10 у мышей, однозначно обуславливали торможение развития атеросклероза [23], уменьшая размеры атеросклеротического повреждения и модифицируя объем бляшек.

Интересно, что снижение содержания и функциональной активности Treg в селезенке атеросклеротических ApoE-KO мышей было зарегистрировано до развития признаков атеросклеротического поражения сосудов [22, 24]. При этом обнаружено, что окисленные ЛПНП ингибируют экспрессию Foxp3 в Treg, подавляя их супрессорную активность [24]. Возможно, это является одним из ведущих механизмов снижения активности Treg при атеросклерозе, который работает в противовес другому механизму, стимулирующему накопление Treg с помощью кинуренина, продукта метаболизма триптофана, уровень которого при воспалительных процессах любого генеза повышается значительно. Повышенный метаболизм триптофана связан с возрастанием активности фермента IDO, за индукцию экспрессии

которого отвечает в основном IFN γ , играющий весомую роль в иммунопатогенезе атеросклероза [25, 26]. Однако при атеросклерозе определяется и другой, существенный механизм подавления супрессорной активности Treg. С одной стороны, при атеросклерозе повышен уровень гомоцистеина. С другой стороны, гомоцистеин подавляет супрессорную активность Treg [27]. Повышение уровня гомоцистеина в крови является патогенным фактором в образовании атеросклеротических бляшек. В культуре макрофагов человека показано, что ангидрид гомоцистеина вызывает агрегацию и преципитацию ЛПНП и образование пенистых клеток после фагоцитоза гомоцистеинилированных ЛПНП агрегатов культивированными макрофагами. Сейчас формируется, и не без оснований, гомоцистеиновая теория атеросклероза и болезней старости [28].

Имеются данные о вкладе ангиотензин-конвертирующего фермента (превращает ангиотензин 1 в ангиотензин 2) в процесс регуляции активности Treg, которая возрастает на фоне введения ингибиторов данного фермента [21]. Возможно, что за этот эффект ингибиторов фермента отвечает ангиотензин 2, уровень которого снижается при действии блокаторов. Показано, что в определенных условиях ангиотензин 2 на фоне его гипертензивного действия через специфические рецепторы стимулирует пролиферацию Т-клеток и их накопление в стенке сосудов, а также, что очень важно, индуцирует синтез TNF α в Т-клетках. Существуют убедительные данные об ингибирующем влиянии TNF α на супрессорную активность Treg [29]. Следует отметить, что блокада ангиотензинового рецептора 1 предотвращает развитие коллаген-индуцированного артрита у животных, тормозя развитие уже развившейся патологии [21]. Перенос Treg в эксперименте предотвращает развитие гипертензии, индуцированной введением ангиотензина II [30].

Помимо описанных выше классических регуляторных клеток с супрессорной активностью в иммунопатогенезе атеросклероза играет роль еще одна субпопуляция регуляторных клеток. Так, описаны CD4 $^{+}$ Т-клетки, экспрессирующие latency-associated peptide (LAP), который является аминокислотным доменом пептида предшественника TGF β , остается нековалентно связанным с пептидом TGF β после распада и образует латентный TGF β -комплекс. Показано, что клетки LAP $^{+}$ с супрессорной активностью обладают антиатерогенным эффектом в экспериментах на мышах за счет подавления Th1-, Th2- иммунных ответов. Возможно, что именно клетки LAP $^{+}$ включены

в процесс индукции и экспансии CD4+CD25+ клеток, продуцирующих активный TGF β с его иммуносупрессорным эффектом [31].

Относительно мишеней, на которые реагируют разные субпопуляции супрессорных клеток, имеются данные, что против сохранных, наивных эпитопов любых аутоантигенов, включая окисленные ЛПНП, реагируют натуральные Treg, а против модифицированных аутоантигенов – iTreg. Данное заключение базируется на том, что из тимуса на периферию мигрируют и предшественники эффекторных Т-клеток с определенной степенью аутоагрессивности, и наивные Treg с задачей не дать последним «сломать» иммунную толерантность и индуцировать аутоиммунную патологию. Индуцированные Treg накапливаются в организме против чужеродных и модифицированных собственных антигенов. Последние распознаются иммунной системой как чужеродные с формированием иммунного ответа, направленного на их ликвидацию и выброс из организма с сохранением толерантности к наивным молекулам.

Таким образом, атеросклероз следует признать заболеванием, в патогенезе которого лежат нарушения функций самых различных клеток иммунной системы с развитием аутоагрессии против собственных молекул благодаря снижению иммуносупрессорной активности регуляторных клеток. В связи с этим терапия атеросклероза должна быть направлена на подавление активности клеток иммунной системы против аутоантигенов.

ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Наиболее обсуждаемой в настоящее время гипотезой возникновения опухоли в организме является «иммунное редактирование опухоли» (cancer immunoediting). Подразумевается три фазы иммунного ответа на развитие опухоли: ликвидация (elimination), равновесие (equilibrium), бегство (escape). Не все здесь ясно. Особенно непонятна фаза равновесия. Можно ли ее зафиксировать? То есть следует думать, что в одно и то же время клетки опухоли растут и размножаются, а эффекторные иммунокомпетентные клетки убивают опухолевые клетки? Вряд ли такое может происходить одновременно. Скорее всего, равновесие – это уже есть «убегание» либо на фоне формирования резистентности опухолевых клеток к цитотоксическому действию эффекторных лимфоцитов, либо на фоне развивающихся иммуносупрессивных механизмов, индуцированных со стороны опухолевых клеток. Ранее нами было выдвинуто предположение, что иммунная

система при встрече с опухолевыми клетками сначала стимулирует их деление до определенного количественного состояния, а уже потом приступает к их ликвидации. За этот промежуток времени опухолевые клетки продуцируют целый ряд биологически активных субстанций, необходимых для существования макроорганизма. Можно предположить, что фаза равновесия является отражением запаздывания или неформирования цитотоксических механизмов на фоне еще продолжающих действие стимулирующих эффектов со стороны клеток иммунной системы.

Как бы то ни было, самое главное, что при росте опухоли фаза убегания обусловлена развитием иммуносупрессии в отношении опухолевых клеток. По существу, речь идет о развитии иммунной толерантности к опухолевым антигенам. При этом в данном процессе принимают участие практически все основные «действующие лица» развивающейся трагедии. Здесь и макрофаги, которые становятся опухоль-ассоциированными, дендритные клетки, приобретшие толерогенные свойства, конечно же, классические Treg, и клетки-супрессоры миелоидного происхождения. Естественно, что все эти клетки активно продуцируют специфические для них супрессивные молекулы, включая TGF β , PGE2, IDO, аргиназу 1 и др. Показано, что клетки большинства опухолей также продуцируют отдельные иммуносупрессивные молекулы, которые способствуют накоплению в самой опухоли тех же Treg. При этом представляется достаточно важным то, что супрессорная активность местных Treg в опухоли гораздо выше активности Treg из периферической крови или других тканей того же пациента [32]. Усилению активности Treg в опухоли могут способствовать клетки, участвующие в локальном воспалении и продуцирующие цитокины типа IFN γ . Последний индуцирует экспрессию на опухолевых и иммунных клетках, инфильтрирующих опухоль, лиганды типа PD-L1 [32].

Не менее значимый интерес представляют данные о том, что при определенных условиях антиген-специфические Treg могут индуцировать формирование опухоль-специфической, локальной иммунной толерантности [33]. При этом, например при раке прямой кишки, определяются Treg, специфичные для нескольких антигенов, ассоциированных с опухолью, таких как карциноэмбриональный антиген, теломераза, антигены HER2/neu и MUC-1. Это свидетельствует, что местная толерантность носит глобальный характер ко многим опухоль-ассоциированным антигенам в данной конкретной опухоли [34]. Опухоль и ее микро-

окружение активно участвуют в процессе привлечения в опухоль Treg. Продуцируя хемокины CCL17 и CCL22, опухолевые клетки обуславливают увеличение миграции Treg в опухоль, где они на месте подавляют активность клеток-эффекторов. Клетки колоректального рака синтезируют хемокин CCL5, который обуславливает не только повышение миграции в опухоль Treg, но и стимулирует их способность убивать противоопухолевые CD8+ Т-клетки апоптозом [35].

В чем все же заключается главная причина различий в иммуносупрессорных механизмах при разных иммунопатологических процессах: аллергии, аутоиммунитете, атеросклерозе, опухолевом росте? Почему в первых трех случаях отмечается гипофункция супрессорного аппарата, в четвертом – гиперфункция? Во всех случаях присутствует антиген, который индуцирует иммунный ответ, всегда сопровождающийся активацией механизмов супрессии, и который заканчивается формированием разной патологии. Может быть, все дело в характеристиках антигенов, индуцирующих иммунный ответ?

Следует принимать во внимание, что определенные опухолевые антигены, используемые в качестве вакцины, могут стимулировать накопление не только специфических противоопухолевых клеток-эффекторов, но и обуславливать увеличение популяции Treg, которые негативно влияют на формирование вакцинального противоопухолевого иммунитета. Кроме всего прочего, сами опухолевые клетки и дендритные клетки (ДК) из лимфатических узлов, дренирующих опухоль, продуцируют TGFβ, который способствует пролиферации Treg.

К ВОПРОСУ О СУПРЕССОРНОЙ ДОМИНАНТЕ

Представленные выше данные литературы однозначно свидетельствуют об иммунопатогенезе как о базисной основе развития всех основных неинфекционных заболеваний человека. С уверенностью, как само собой разумеющееся, следует утверждать, что патогенез инфекционных заболеваний напрямую связан с иммунной системой, с ее способностью или неспособностью формировать иммунный ответ против возбудителя. Представляется архиважным подчеркнуть, что неполноценное функционирование иммунной системы во многом определяется активностью иммунорегуляторных клеток самого различного генеза. Здесь Т- и В-лимфоциты, макрофаги М2, стволовые мезенхимальные и дендритные клетки, клетки-супрессоры миелоидного происхождения,

эритробласты, фибробласты и другие клеточные элементы. Еще многое не известно о супрессорных механизмах и принципах взаимодействия всех супрессорных клеток между собой. В то же время необходимо осознавать, что иммунологическая парадигма базируется на существовании иммуносупрессорной догмы развития болезни. Именно функциональная активность супрессорных клеток определяет иммунопатогенез конкретной патологии, когда аутоиммунные и аллергические заболевания, атеросклероз развиваются на фоне низкой активности клеток-супрессоров, а онкозаболевания – при их гиперфункции.

К ВОПРОСУ ОБ ИММУНОТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ С БАЗИСНЫМ ИММУНОПАТОГЕНЕЗОМ

Представляется логичным считать, что основополагающей терапией заболеваний, в основе которых лежат нарушения в нормальном функционировании иммунной системы, должна стать иммунотерапия. По-видимому, можно говорить о том, что любой лекарственный препарат, любые методы физиотерапии, радиационные и химиотерапевтические воздействия в той или иной степени влияют на функции иммунной системы. К сожалению, не представляется возможным подробно изучить иммуномодулирующие эффекты огромного количества лекарственных препаратов различной направленности действия, используемых человеком в терапии основных заболеваний. Вне всяких сомнений, подобного рода знания оказали бы существенное влияние на эффективность лечения любого, именно любого, заболевания, особенно при их комплексном использовании.

В последние десятилетия сформировался новый вид «вселенской» терапии, обозначаемой как иммунотерапия, с использованием лекарственных препаратов биологического происхождения, оказывающих влияние на функции иммунной системы. Как правило, эти препараты либо являются производными клеток иммунной системы (например, цитокины, антитела и др.), либо состоят из клеток иммунной системы с разными функциями, хотя и их терапевтический эффект реализуется через продукцию широкого спектра факторов. Исходя из этого, иммунотерапию условно можно разделить на две составляющие: молекулярную и клеточную. Первую можно разделить на регуляторные (цитокины, ростовые факторы, растворимые рецепторы) и эффекторные молекулы (антитела, цитолитические). Клеточная иммунотерапия базируется на использовании всего разнообразия клеточных элементов иммунной системы, включая

ДК и макрофаги, Т- и В-лимфоциты, НК- и мезенхимальные стволовые клетки.

Наибольшее распространение в терапевтической клинике получило применение моноклональных антител (моАт). В основе действия моАт лежат иммунные механизмы «антиген – антитело». Терапевтические моАт уже активно используются: в кардиологии при артериальной гипертензии (анти- α IIb/IIIa), инфаркте и атеросклерозе; неврологии при болезни Альцгеймера (AZD3102); офтальмологии при макулярной дистрофии (анти-VEGF A) и неоваскуляризации сетчатки (анти-SF1); при терапии остеопороза (анти-RANKL), системного склероза, келоидов, постоперационных рубцов, идиопатического фиброза легких (анти-TGF β 1), пневмосклероза (анти-CTGF), гиперпаратиреоидизма (анти-PtH), мышечной дистрофии (анти-GDF-8) и т.д. Особенно часто моАт применяются в онкологии и при лечении аутоиммунных заболеваний. Более 70 оригинальных продуктов из моАт используется в современной практической медицине, и их количество неуклонно возрастает [36].

Значительные успехи достигнуты в терапии многих заболеваний с помощью применения цитокинов: TNF α , IL-6, IL-1, IL-2, IL-12/IL-23, IL-17A, IL-10 [37–39]. В последние годы все больше внимания в клинике уделяется иммунотерапии с применением клеточных технологий. Данный метод имеет ряд существенных преимуществ. Так, терапия моАт, цитокинами и растворимыми рецепторами требует длительного, многокурсового их использования, что в силу их плеiotропных и конкордантных механизмов их действия приводит к побочным эффектам. При применении методов клеточной иммунотерапии побочных эффектов не возникает, так как все воздействия на них моАт, цитокинов или гормонов осуществляется вне организма. Главное в этом случае – это специфичность иммунного ответа на конкретный антиген, а не иммунную систему в целом.

К настоящему времени наибольшее распространение получила терапия опухолевых заболеваний дендритными клетками [40]. Эти же клетки, на наш взгляд, представляют интерес для терапии аутоиммунных заболеваний, так как с их помощью можно индуцировать толерантность к тем аутоантигенам, которые являются индукторами развития аутоиммунной патологии в результате «полома» механизмов толерантности [41]. Активно внедряются в клиническую практику мезенхимальные стволовые клетки в качестве клеток-супрессоров для лечения аутоиммунных заболеваний и профилактики реакции «транс-

плантат против хозяина» при пересадке аллогенных стволовых клеток в лечении гемобластозов [42, 43]. Для стимуляции регенеративных процессов при различного рода повреждениях органов и тканей применяются субпопуляции макрофагов M2 [44, 45], для подавления активности аутоагрессивных Т-лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях – Т-регуляторные клетки [30, 46], а также клетки с направленностью против идиотипов Т-клеточных рецепторов и клеточных эрго-типов аутоагрессивных Т-клеток [47–50].

В настоящее время в клинической практике достаточно широко применяются методы молекулярной и клеточной иммунотерапии, основанной на использовании биологических препаратов. Однако следует подчеркнуть, что, несмотря на положительные эффекты проводимой иммунотерапии отдельными препаратами, о полном выздоровлении больных с ревматоидным артритом, бронхиальной астмой, раком прямой кишки и другими говорить не приходится. Иммунопатогенез этих заболеваний является многокомпонентным, с нарушением нормального функционирования различных звеньев иммунной системы. Следовательно, иммунотерапия должна быть комплексной. Например, стимуляция противоопухолевого иммунитета с помощью ДК, сенсibilизированных опухолевым антигеном, должна сочетаться с воздействиями, подавляющими активность Treg. При аутоиммунной патологии, напротив, индукция толерантности с помощью толерогенных ДК должна сочетаться с активирующим действием на Treg. Следует полагать, только сочетанная иммунотерапия позволит в первом случае сломать иммунную толерантность к опухолевым антигенам, во втором – восстановить толерантность к аутоантигенам и тем самым в обоих случаях добиться излечения пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накоплен огромный фактический материал о ведущей роли нарушений функций иммунной системы в патогенезе основных заболеваний человека. Эти изменения главным образом касаются популяции клеток с супрессорной активностью. При опухолевом росте их активность резко возрастает, а при аутоиммунной патологии – подавляется. Коль скоро иммунная парадигма и супрессорная доминанта принимаются как данность, то ведущее место в лечении больных с этой патологией должна занимать иммунотерапия, эффективность которой при лечении опухолевых и аутоиммунных заболеваний в ряде случаев можно считать доказанной.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Prendergast G.C., Metz R., Muller A.J., Merlo L.M., Mandik-Nayak L. IDO2 in immunomodulation and autoimmune disease. *Front Immunol.* 2014; 5: 585. DOI: 0.3389/fimmu.2014.00585.
- Kawashiri S.-Y., Kawashiri A., Okada A., Koga T., Tamai M., Yamasaki S., Nakamura H., Origuchi T., Ida H., Eguchi K. CD4+CD25^{high}CD127^{low}/– Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2011; 38 (12): 2517–2521. DOI: 10.3899/jrheum.110283.
- Valencia X., Stephens G., Goldbach-Mansky R., Wilson M., Shevach E.M., Lipsky P.E. TNF downmodulation the function of human CD4+CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood.* 2006; 108 (1): 253–261. DOI: 10.1182/blood-2005-11-4567.
- Nakano S., Morimoto S., Suzuki S., Tsushima H., Yamanaka K., Sekigawa I., Takasaki Y. Immunoregulatory role of IL-35 in T cells of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2015; 54 (8): 1498–1506. DOI: 10.1093/rheumatology/keu528.
- Chan J.L., Tang K.C., Patel A.P., Bonilla L.M., Pierobon N., Ponzo N.M., Rameshwar P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon- γ . *Blood.* 2006; 107 (12): 4817–4824. DOI: 10.1182/blood-2006-01-0057 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1895812/>.
- Yoshizaki A., Miyagaki T., DiLillo D.J., Matsushita T., Horikawa M., Kountikov E.I., Spolski R., Poe J.C., Leonard W.J., Tedder T.F. Regulatory B cells control T cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature.* 2012; 491 (7423): 264–268. DOI: 10.1038/nature11501.
- Kalampokis I., Yoshizaki A., Tedder T.F. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune diseases. *Arthritis Research & Therapy.* 2013; 15 (1): 1. DOI: 10.1186/ar3907.
- Herrero C., Perez-Simon J.A. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2010; 43 (5): 425–430. PMID: 20490429. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490429>.
- Noël D., Djouad F., Bouffi C., Mrugala D., Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leukemia & Lymphoma.* 2007; 48 (7): 1283–1289. DOI: 10.1080/10428190701361869.
- Djouad F., Bouffi C., Ghannam S., Noël D., Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2009; 5 (7): 392–399. DOI: 10.1038/nrrheum.2009.104. <http://www.nature.com/articles/nrrheum.2009.104>
- Bouffi C., Djouad F., Mathieu M., Noël D., Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and rheumatoid arthritis: risk or benefit. *Rheumatology.* 2009; 48 (10): 1185–1189. DOI: 10.1093/rheumatology/kep162.
- Liotta F., Angeli R., Cosmi L., Film L., Manuelli C., Frosali F., Mazzinghi B., Maggi L., Pasini A., Lisi V., Santarlasci V., Consoloni L., Angelotti M.L., Romagnani P., Parronchi P., Krampera M., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells.* 2008; 26 (1): 279–289. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0454.
- Bacigalupo A., Valle M., Podesta M., Bacigalupo A., Valle M., Podesta M., Pitto A., Zocchi E., De Flora A., Pozzi S., Luchetti S., Frassoni F., Van Lint M.T., Piaggio G. T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia. *Exp. Hematology.* 2005; 33 (7): 819–827. DOI: 10.1016/j.exphem.2005.05.006.
- Liu L.H., Chen B., Sun Z., Ye L.P., Shi B., Jin J.G., Zhao C.H. Immuno-suppressive effects on T cells mediated by mesenchymal stem cells from patients with myelodysplastic syndrome. *J. Exp. Hematology.* 2008; 16 (2): 299–304. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18426653>.
- Perez-Simon J.A., Tabera S., Sarasquete M.E., Diez-Campelo M., Canchado J., Sánchez-Abarca L.I., Blanco B., Alberca I., Herrero-Sánchez C., Cacizo C., San Miguel J.F. Mesenchymal stem cells are functionally abnormal in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Cytotherapy.* 2009; 11 (6): 1–8. DOI: 10.3109/14653240903051558.
- Eusebio M., Kuna P., Kraszula L., Kurczyk M., Pietruczuk M. Allergy-related changes in levels of CD8+CD25+Foxp3 (bright) Treg cells and Foxp3 mRNA expression in peripheral blood: the role of IL-10 or TGF- β . *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2014; 28 (3): 461–470. PMID: 25316133 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25316133>.
- Kanamori M., Nakatsukasa H., Okada M., Lu Q., Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol.* 2016; 37 (11): 803–811. DOI: 10.1016/j.it.2016.08.012.
- Gupta P., Vijaeen V.K., Bansal S.K. Changes in protein profile of erythrocyte membrane in bronchial asthma. *J. Asthma.* 2012; 49 (2): 129–133. DOI: 10.3109/02770903.2011.649873.
- Taleb S., Tedgui A., Mallat Z. Adaptive T cell immune responses and atherogenesis. *Current Opinion in Pharmacology.* 2010; 10: 197–202. DOI: 10.1016/j.coph.2010.02.003.
- Nilsson J., Hansson G.K. Autoimmunity in atherosclerosis: a protective response losing control? *J. Intern. Med.* 2008; 263: 464–478. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2008.01945.x.
- Platten M., Youssel S., Hur E.M., Ho P.P., Han M.H., Lanz T.V., Phillips L.K., Goldstein M.J., Bhat R., Raine C.S., Sobel R.A., Steinman L. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates Th1- and Th17-mediated autoimmunity. *PNAS.* 2009; 106 (35): 14948–14953. DOI: 10.1073/pnas.0903958106.
- Ait-Oufella H., Salomon B.L., Potteaux S., Robertson A.K., Gourdy P., Zoll J., Merval R., Esposito B.,

- Cohen J.L., Fisson S., Flavell R.A., Hansson G.K., Klatzmann D., Tedgui A., Mallat Z. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat. Med.* 2006; 12 (2): 178–180. DOI: 10.1038/nm1343.
23. Taleb S., Tedgui A., Mallat Z. Regulatory T-cell immunity and its relevance to atherosclerosis *J. Intern. Med.* 2008; 263 (5): 489–499. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2008.01944.x.
 24. Mor A., Philips M.R., Pillinger M.H. The role of Ras signaling in lupus T lymphocytes: biology and pathogenesis. *Clin. Immunol.* 2007; 125 (3): 215–223. DOI: 10.1016/j.clim.2007.08.008.
 25. McLaren J.E., Ramji D.P. Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20 (2): 125–135. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2008.11.003.
 26. Mezrich J.D., Fechner J.H., Zhang X., Johnson B.P., Burlingham W.J., Bradfield C.A. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J. Immunol.* 2010; 185 (6): 3190–3198. DOI: 10.4049/jimmunol.0903670. <http://www.jimmunol.org/content/185/6/3190>.
 27. Feng J., Zhang Z., Kong W., Liu B., Xu Q., Wang X. Regulatory T cells ameliorate hyperhomocysteinaemia-accelerated atherosclerosis in apoE^{-/-} mice. *Cardiovascular Res.* 2009; 84: 155–163. DOI: 10.1093/cvr/cvp182.
 28. McCully K.S. Homocysteine metabolism, atherosclerosis and diseases of aging. *Compr. Physiol.* 2016; 6: 471–505. DOI: 10.1002/cphy.c150021 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26756640>.
 29. Wang J., van Dongen H., Scherer H.U., Huizinga T.W.J., Toes R.E. Suppressor activity among CD4, CD25 T cells is discriminated by membrane-bound tumor necrosis factor. *Arthritis & Rheumatism.* 2008; 58 (6): 1609–1618. DOI: 10.1002/art.23460.
 30. Barhoumi T., Kasal D.A., Li M.W., Barhoumi T., Kasal D.A., Li M.W., Shbat L., Laurant P., Neves M.F., Paradis P., Schiffrin E.L. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension.* 2011; 57 (3): 469–476. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162941.
 31. Sasaki N., Yamashita T., Takeda M., Shinohara M., Nakajima K., Tawa H., Usui T., Hirata K-i. Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Circulation.* 2009; 120: 1996–2005. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.863431.
 32. Bardhan K., Anagnostou T., Boussiotis V.A. The PD1:PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. *Front Immunol.* 2016; 7: 1–17. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00550 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5149523/>.
 33. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 295–307. DOI: 10.1038/nri1806
 34. Byrne W.L., Mills K.H., Lederer J.A., O'Sullivan G.C. Targeting regulatory T cells in cancer. *Cancer Res.* 2011; 71 (22): 6915–6920. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1156. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/22/6915>.
 35. Chang L.Y., Lin Y.C., Mahalingham J., Huang C.T., Chen T.W., Kang C.W., Peng H.M., Chu Y.Y., Chiang J.M., Dutta A., Day Y.J., Chen T.C., Yeh C.T., Lin C.Y. Tumor-derived chemokine CCL5 enhances TGF- β -mediated killing of CD8(+) T cells in colon cancer by T-regulatory cells. *Cancer Res.* 2012; 72 (5): 1092–1102. DOI: 10.1158/0008-5472.can-11-2493. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/72/5/1092>.
 36. Becker D.M., Jones S.D., Levine H.L. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs.* 2015; 7 (1): 9–14. DOI: 10.4161/19420862.2015.989042.
 37. Amedei A., Prisco D., D'Elia M.M. The use of cytokines and chemokines in the cancer immunotherapy. *Recent. Pat. Anticancer. Drug. Discov.* 2013; 8 (2): 126–142. PMID: 22894642. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22894642>.
 38. Holdsworth S.R., Gan P.Y. Cytokines: names and numbers you should care about. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2015; 10 (12): 2243–2254. DOI: 10.2215/cjn.07590714. <http://cjasn.asnjournals.org/content/10/12/2243>.
 39. Mullen L., Adams G., Layward L., Vessillier S., Annenkov A., Mittal G., Rigby A., Sclanders M., Baker D., Gould D., Chernajovsky Y. Latent cytokines for targeted therapy of inflammatory disorders. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014; 11 (1): 101–110. DOI: 10.1517/17425247.2014.863872.
 40. Sennikov S.V., Khantakova J.N., Kulikova E.V., Obleshkova I.F., Shevechenko J.A. Modern strategies and capabilities for activation of the immune response against tumor cells. *Tumour Biol.* 2017; 39 (5): 98380. DOI: 10.1177/1010428317698380.
 41. Сенников С.В., Куликова Е.В., Кнауэр Н.Ю., Хантакова Ю.Н. Молекулярно-клеточные механизмы, опосредуемые дендритными клетками, участвующими в индукции толерантности. *Медицинская иммунология.* 2017; 19 (4): 359–374. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-359-374 [Sennikov S.V., Kulikova E.V., Knauer N.Yu., Khantakova Yu.N. Molecular and cellular mechanisms mediated by dendritic cells involved in the induction of tolerance. *Medical Immunology.* 2017; 19 (4): 359–374 (in Russ.)]. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-359-374.
 42. Zhang L., Yu J., Wei W. Advance in Targeted Immunotherapy for Graft-Versus-Host Disease. *Front Immunol.* 2018; 16 (9): 1087. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01087.
 43. Liu M., Han Z.C. Mesenchymal stem cells: biology and clinical potential in type 1 diabetes therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 2008; 12 (4): 1155–1168. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00288.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3865657/>.
 44. Derecki N.C., Quinlan K.V., Kipnis J. Alternatively activated myeloid (M2) cells enhance cognitive function in immune compromised mice. *Brain Behav. Immun.* 2011; 25 (3): 379–385. DOI: 10.1016/j.bbi.2010.11.009.

45. Chernykh E., Shevela E., Kafanova M., Sakhno L., Polovnikov E., Ostanin A. Monocyte-derived macrophages for treatment of cerebral palsy: a study of 57 cases. *Journal of Neurorestoratology*. 2018; 6: 41–47. DOI: 10.2147/jn.s158843.
46. Sicard A., Boardman D.A., Levings M.K. Taking regulatory T-cell therapy one step further. *Curr Opin Organ Transplant*. 2018. Jul 30. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000566. <https://insights.ovid.com/crossref?an=00075200-900000000-99107>.
47. Seledtsova G.V., Ivanova I.P., Shishkov A.A., Seledtsov V.I. Immune responses to polyclonal T-cell vaccination in patients with progressive multiple sclerosis. *J. Immunotoxicol.* 2016; 13 (6): 879–884. DOI: 10.1080/1547691X.2016.1223767.
48. Wu Y., Zhang Y., Xu X., Lv P., Gao X. Anti-idiotypic regulatory responses induced by vaccination with DNA encoding murine TCR Valpha5 and Vbeta2. *Cell. Mol. Immunol.* 2007; 4 (4): 287–293. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17764619>.
49. Karussis D., Shor H., Yachnin J., Lanxner N., Amiel M., Baruch K., Keren-Zur Y., Haviv O., Filippi M., Petrou P., Hajag S., Vourka-Karussis U., Vaknin-Dembinsky A., Khoury S., Abramsky O., Atlan H., Cohen I.R., Abulafia-Lapid R. T cell vaccination benefits relapsing progressive multiple sclerosis patients: a randomized, double-blind clinical trial. *PLoS One*. 2012; 7 (12): e50478. DOI: 10.1371/journal.pone.0050478. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3522721/>.
50. Ильина Н.А., Гойман Е.В., Кудаева О.Т., Колесникова О.П., Кожевников В.С. Антиэрготипический ответ: влияние на иммунный ответ и развитие аутоиммунной патологии в эксперименте. *Медицинская иммунология*. 2011; 13 (1): 29–34. [Ilyina N.A., Goiman E.V., Kudaeva O.T., Kolesnikova O.P., Kozhevnikov V.S. Anti-ergotypic response: role in normal immune response and autoimmune pathology in the experimental model. *Medical Immunology*. 2011; 13 (1): 29–34 (in Russ.)]. DOI: 10.15789/1563-0625-2011-1-29-34.

Сведения об авторе

Козлов Владимир Александрович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, вице-президент Российского научного общества иммунологов, научный руководитель НИИФКИ, г. Новосибирск.

(✉) Козлов Владимир Александрович, e-mail: vakoz40@yandex.ru.

Author information

Kozlov Vladimir A., DM, Professor, Academician of RAS, Scientific Adviser of RIFCI, Vice-president of the Russian Society for Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) Kozlov Vladimir A., e-mail: vakoz40@yandex.ru.

Received 26.10.2018

Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 26.10.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Индукцированная иммуносупрессия в критических состояниях: диагностические возможности в клинической практике

Григорьев Е.В.^{1,2}, Матвеева В.Г.¹, Шукевич Д.Л.^{1,2},
Радивилко А.С.¹, Великанова Е.А.¹, Ханова М.Ю.¹

¹ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ)
Россия, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6

² Кемеровский государственный медицинский университет (КемГМУ)
Россия, 650000, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22

РЕЗЮМЕ

Иммунная система в критических состояниях инициирует локальное воспаление в области повреждения, при дисбалансе местных и системных реакций воспаления инфекционного или неинфекционного генеза развивается системный воспалительный ответ, который характеризуется стадийностью «гипервоспаление – компенсаторная противовоспалительная реакция» с вероятным исходом в полиорганную недостаточность. Финальная стадия критического состояния, следовательно, будет характеризоваться индуцированной иммуносупрессией с нарушением функции нейтрофилов, моноцитов и макрофагов, дендритных клеток, выбросом супрессорных клеток миелоидного происхождения. Цель обзора – оценка вклада различных компонентов иммунной реакции в формирование индуцированной иммунной супрессии с позиции кандидатных диагностических маркеров.

Ключевые слова: системная воспалительная реакция, персистирующая полиорганная недостаточность, индуцированная иммуносупрессия.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (Конкурс НШ-2018, НШ 2696.2018.7).

Для цитирования: Григорьев Е.В., Матвеева В.Г., Шукевич Д.Л., Радивилко А.С., Великанова Е.А., Ханова М.Ю. Индуцированная иммуносупрессия в критических состояниях: диагностические возможности в клинической практике. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 18–29. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-18-29>.

Induced immunosuppression in critical care: diagnostic opportunities in clinical practice

Grigoryev E.V.^{1,2}, Matveeva V.G.¹, Shukevich D.L.^{1,2},
Radivilko A.S.¹, Velikanova E.A.¹, Khanova M.Yu.¹

¹ *Research Institute for Complex Issues in Cardiovascular Diseases (RICICD)*
6, Sosnovy Blv., Kemerovo, 650002, Russian Federation

² *Kemerovo State Medical University (KemSTU)*
22, Voroshilov Str., Kemerovo, 650000, Russian Federation

ABSTRACT

The immune system in critical illnesses initiates local inflammation in the damaged area. In the absence of a balance between local and systemic inflammations, an infectious or non-infectious systemic inflammatory response follows, which has a stage of "hyper inflammation - compensatory anti-inflammatory response", that may result in multi-organ failure. The final stage of critical illnesses, therefore, will be characterized by induced immunosuppression with the impaired function of neutrophils, monocytes, macrophages and dendritic cells and release of myeloid-derived suppressor cells. The aim of the review is to evaluate the contribution of various components of the immune response to the formation of induced immune suppression from the perspective of candidate diagnostic markers.

Key words: systemic inflammatory reaction, persistent multi-organ failure, induced immunosuppression.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the grant for government support to leading science schools of the Russian Federation (contest NSH-2018, NSH 2696.2018.7).

For citation: Grigoryev E.V., Matveeva V.G., Shukevich D.L., Radivilko A.S., Velikanova E.A., Khanova M.Yu. Induced immunosuppression in critical care: diagnostic opportunities in clinical practice. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 18–29. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-18-29>.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что системный воспалительный ответ (SIRS) как основа формирования критического состояния вне зависимости от первичной причины (инфекция – сепсис, отсутствие инфекции – травма, искусственное кровообращение) в своем развитии проходит две последовательные стадии. Первая стадия – гиперергическая воспалительная реакция, иногда называемая «цитокиновый шторм». В эту фазу ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны (DAMP) (аларминов) и патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) активируют реакции врожденного иммунитета. Активация врожденного иммунитета сопровождается мощным выбросом провоспалительных медиаторов, которые продолжают усиливать интенсивность иммунного ответа и запускают механизмы адаптивного иммунитета [1].

Одновременно с гиперактивацией провоспалительных механизмов в организме пациентов с SIRS развиваются компенсаторные механизмы, направленные на предотвращение избыточного воспаления и ослабления его чрезмерной ак-

тивности [2]. Механизмы отрицательной обратной связи, имеющие защитный эффект в первые часы, с течением времени могут стать дисрегуляторными и патологическими, приводя к стойкому подавлению иммунитета и высокому риску рецидивирующих инфекций [3]. В многочисленных клинических и экспериментальных работах, посвященных SIRS и сепсису, описаны значительные изменения иммунологических показателей. При этом фаза иммунной супрессии является преобладающим иммунологическим ответом у большинства пациентов в период после 7–14 сут персистенции критического состояния [4]. Клинически у пациентов с сепсисом это проявляется трудностями преодоления первичной бактериальной инфекции в условиях активной терапии, в том числе антибактериальной. В период иммуносупрессии пациенты с SIRS и сепсисом приобретают нозокомиальные и оппортунистические инфекции, на этом фоне у них формируется полиорганная недостаточность [5].

Дисрегуляция иммунной системы является одним из движущих факторов в развитии полиорганной недостаточности. Однако патофизио-

логические механизмы дисрегуляции иммунных воспалительных процессов сложны и недостаточно изучены, они динамично изменяются во время прогрессирования заболевания и представляют собой гетерогенный иммунологический статус, специфичный для каждого пациента. В настоящее время усилия ученых сосредоточены на понимании основных изменений во врожденном и адаптивном компонентах иммунитета у критических пациентов, которые позволят разработать своевременную, точную и персонализированную терапию. Для этих целей наиболее подходящим объективным лабораторным инструментом является проточная цитометрия, поскольку данный метод обладает широкими возможностями и высокой точностью при относительно коротком периоде преаналитического этапа. В обзоре представлены наиболее информативные показатели врожденного и адаптивного клеточного иммунитета для диагностики и мониторинга иммуносупрессии, индуцированной SIRS.

НЕЙТРОФИЛЫ

Количество нейтрофилов в циркулирующей крови повышается за счет двух механизмов: выброса из костного мозга и рекрутирования из маргинального пула в циркулирующий.

Большинство данных о функции и состоянии нейтрофилов при сепсисе как «модели» неинфекционного SIRS были получены в первые часы критического состояния и показали неоднозначные функциональные изменения, такие как нарушение бактериального фагоцитоза (активация или снижение, незавершенный фагоцитоз), увеличение синтеза активных форм кислорода, снижение хемотаксиса [6]. В дальнейшем возможно усугубление имеющейся дисфункции нейтрофилов или изменение ее направления на противоположное. Все эти дефекты приводят к недостаточности бактериального клиренса, снижению функции нейтрофилов и повышению восприимчивости к инфекции [7]. Неудивительно, что пациенты с выраженной дисфункцией нейтрофилов более подвержены нозокомиальным и вторичным инфекциям [8]. С помощью проточной цитометрии возможно провести оценку функциональных свойств клеток, однако необходимо учитывать влияние большого количества внешних и внутренних факторов (фаза заболевания, техника забора крови, хранение и пробоподготовка материала) на результаты функциональных тестов.

Известна высокая информативность соотношения незрелых и зрелых форм нейтрофилов как предикторов негативных последствий при сепси-

се. Незрелые формы нейтрофилов характеризуются более низкой экспрессией CD10 и CD16 (CD10-/CD16low), обладают иммунодепрессивными функциями и связаны с увеличением ранней смертности после сепсиса [9]. Уникальная популяция незрелых форм нейтрофилов CD10-/CD16low исследована у кардиохирургических пациентов, зарегистрировано ее повышение в крови уже в периоперационном периоде. Именно CD10-/CD16low составляют значительную часть циркулирующего пула нейтрофилов после кардиохирургического вмешательства (более 40% циркулирующих нейтрофилов), формируют нейтрофильный сдвиг формулы влево, влияют на фенотип и функциональную активность циркулирующих нейтрофилов [10].

МОНОЦИТЫ И МАКРОФАГИ

Моноциты и макрофаги играют решающую роль в запуске и регуляции иммунных реакций организма [11]. Моноциты и макрофаги – главные участники в формировании «цитокиновой бури» в гиперактивную фазу SIRS и сепсиса, являются важным звеном в запуске и поддержании иммуносупрессии. Наиболее известным функциональным дефектом в моноцитах и макрофагах является «эндотоксиновая толерантность» [12], которая проявляется в снижении высвобождения провоспалительных цитокинов в ответ на эндотоксин (LPS) и другие виды лигандов toll-подобных рецепторов (toll-like receptor, TLR) [13]. Данный феномен затрагивает не только циркулирующие моноциты, но и ретикулярные моноциты селезенки (спленоциты). «Эндотоксиновая толерантность» напрямую связана с иммуносупрессией, поскольку снижение продукции цитокинов блокирует дальнейшее расширение иммунного ответа и вовлечение клеток адаптивного иммунитета.

Существуют два метода функционального тестирования моноцитов *in vitro* на способность отвечать на иммунную провокацию для выявления индуцированной иммуносупрессии. Один из них основан на измерении концентрации цитокинов в супернатанте клеточной культуры в ответ на стимуляцию [14], другой – на исследовании внутриклеточного синтеза цитокинов. Метод измерения внутриклеточной концентрации цитокинов используется в работе T. Fumeaux и соавт. (2004), которая демонстрирует, что моноциты септических пациентов характеризуются преобладающим противовоспалительным фенотипом с увеличением количества интерлейкина (IL) 10 и фактора некроза опухоли альфа (TNFα) [15].

Отмечается универсальность основных механизмов формирования «эндотоксиновой толерантности» моноцитов и макрофагов при септическом и стерильном SIRS. Широко известна гипореактивность при сепсисе, однако «эндотоксиновая толерантность» моноцитов также зарегистрирована во время операции на аорте, при тепловой травме, печеночной и почечной ишемии и реперфузии, коронарной окклюзии, геморрагическом шоке [16]. Защитные механизмы иммуносупрессии на начальном этапе гиперактивации иммунного ответа у пациентов с SIRS и сепсисом в дальнейшем могут усугубляться и вести к негативным последствиям. В частности, формируется анергия моноцитов и макрофагов [17], которая помимо «толерантности к эндотоксину» характеризуется перестройкой фенотипа на иммуносупрессивный со сниженной способностью к презентации антигена [18], что определяет повышенный риск нозокомиальных инфекций и развития осложнений. Иммуносупрессивный фенотип моноцитов при SIRS и сепсисе характеризуется снижением экспрессии ключевых генов молекул главного комплекса гистосовместимости типа MHC II и костимулирующих молекул (CD86, CD40 и HLA-DR), что опосредует нарушение антигенпрезентирующей способности клеток.

Кроме того, у пациентов с сепсис-индуцированной иммуносупрессией, а также после кардио-плегии во время кардиохирургических операций детектируется значительное уменьшение экспрессии хемокинового рецептора CX3CR1 (рецептора к фракталкину – CX3CL1). Поскольку взаимодействие CX3CR1 с лигандом (CX3CL1) опосредует хемотаксис, адгезию и миграцию провоспалительных клеток в область повреждения или инфекции, формируя инфильтрацию тканей [19], снижение экспрессии CX3CR1 на моноцитах препятствует их эмиграции и далее – фагоцитозу и санации очага.

Наиболее изученным маркером супрессивной функциональной перестройки моноцитов является снижение экспрессии на их поверхности молекул MHC II (HLA II). Действительно, низкая экспрессия HLA-DR на моноцитах коррелирует с более низким синтезом TNF α и IL-1 в ответ на стимуляцию [20], снижением антигенпрезентирующей способности клеток [21] и уровнем экспрессии ими костимуляторной молекулы CD86 [22]. Этот биомаркер является самым популярным параметром в мониторинге иммуносупрессии при различных критических состояниях. В клинических исследованиях величина и длительность персистенции снижения HLA-DR на моно-

цитах коррелируют с увеличением смертности и частоты возникновения инфекций [23], связанных с оказанием медицинской помощи (ИСОМП) у пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [24]. Следует отметить, что у пациентов, перенесших кардиохирургическую операцию, мониторинг уровня экспрессии HLA-DR на моноцитах в течение первых суток после операции не позволяет прогнозировать повышенный риск послеоперационных SIRS, сепсиса или инфекционных осложнений. Функциональные тесты подтверждают супрессорные фенотипические изменения моноцитов и демонстрируют более низкий уровень пролиферации Т-лимфоцитов в стимулированной LPS смешанной культуре лимфоцитов и моноцитов от септических пациентов по сравнению с активностью Т-клеточной пролиферации у здоровых доноров.

СУПРЕССОРНЫЕ КЛЕТКИ МИЕЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ (MDSC)

MDSC представляют собой гетерогенную популяцию незрелых миелоидных клеток с мощной иммуносупрессивной активностью в отношении различных типов клеток, преимущественно Т-лимфоцитов. Первоначально MDSC были описаны у онкологических пациентов как клетки с мощной способностью подавления иммунного ответа, при этом они поддерживали ангиогенез, инвазию и метастазирование опухолей в отдаленные сайты [25]. До недавнего времени были сложности в сравнении и анализе данных, полученных в различных научных лабораториях, что связано с отсутствием общих стратегий гейтирования и описания фенотипа MDSC. В связи с этим были разработаны и в 2016 г. опубликованы рекомендации по номенклатуре и стандартным характеристикам основных популяций MDSC. Предложено выделять три основные популяции MDSC: полиморфно-ядерные или гранулоцитарные PMN-MDSC, моноцитарные M-MDSC и незрелые ранние eMDSC [26].

Минимальными (и в настоящее время достаточными) фенотипическими критериями для выделения и характеристики MDSC у человека являются: CD11b+CD14+HLA-DR^{low}/–CD15 – для M-MDSC; CD14–CD11b+CD15+ или CD11b+CD14–CD66b+ для PMN-MDSC; Lin[–] (включая CD3, CD14, CD15, CD19, CD56) HLA-DR–CD33+ для eMDSC.

M-MDSC подавляют Т-клеточные реакции, связанные с производством NO и цитокинов. PMN-MDSC способны к супрессии, прежде всего антиген-специфичных иммунных реакций. Важный механизм индукции антигенспецифической

иммунной толерантности Т-клеток [27] связан с синтезом М-MDSC и PMN-MDSC активных форм кислорода.

Показано, что раннее увеличение количества MDSC ассоциируется с ранней летальностью, а их персистирующая экспансия – с длительностью нахождения в ОРИТ. С помощью мультивариантного анализа доказано, что стойкое повышение PMN-MDSC является сильным независимым предиктором нозокомиальных инфекций и плохого прогноза [28], что свидетельствует о переходе септического процесса в фазу индуцированной иммуносупрессии. Однако данная особенность касается не только сепсиса, но и других системных воспалительных реакций. Высокий уровень PMN-MDSC в крови пациентов в момент поступления в ОРИТ является предиктором смертности в первые 7 сут. Повышение активности аргиназы в крови у этих пациентов прямо коррелировало с уровнем PMN-MDSC [29]. Исследование авторов показало снижение концентрации в плазме крови аргинина у критических пациентов, что ассоциировалось с иммуносупрессией [30].

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ

Дендритные клетки (DCs) являются короткоживущими иммунными клетками. Из костного мозга предшественники дендритных клеток выходят в кровь (циркулирующие DC) и далее мигрируют в ткани (тканевые DC), при этом большая часть DC находится в тканях. DC являются антигенпрезентирующими клетками, они индуцируют Т-клеточный иммунный ответ, а цитокины, синтезируемые DC, активируют реакции как врожденного, так и адаптивного иммунитета [31].

Большинство работ посвящено изучению количественных и качественных изменений DC у пациентов с индуцированной сепсисом иммуносупрессией. Значительно меньше исследований касается подобных нарушений при развитии неинфекционного SIRS. Снижение количества циркулирующих DCs зарегистрировано у пациентов с сепсисом [32] и септическим шоком [33]. Обнаружено значительное снижение количества DC в селезенке у пациентов, умерших от сепсиса, по сравнению с их численностью в случае ранней смерти от ожогов [34].

Известно, что DC при развитии системного воспалительного ответа очень уязвимы к апоптозу, при этом индукция апоптоза DC способствует длительной иммуносупрессии и персистенции инфекции [35]. Количественное снижение DCs связано с их фенотипическими изменениями. Так, развитие иммуносупрессии, обусловленной

SIRS и сепсисом, сопровождается снижением антиген-презентирующей способности DC, что проявляется уменьшением экспрессии HLA-DR, костимуляторных молекул CD80/86, транскрипционного фактора IRF4. При этом в DC активируются противовоспалительные свойства, в том числе за счет усиления синтеза IL-10 и трансформирующего фактора роста бета (TGFβ) [36]. В целом количество циркулирующих DC и экспрессия на них HLA-DR могут быть информативным показателем иммуносупрессии при SIRS и сепсисе, что требует дальнейшего детального изучения.

ЛИМФОЦИТЫ

Уменьшение числа лимфоцитов приводит к снижению резистентности организма к патогенным микроорганизмам и является важным проявлением иммунодефицита у критических пациентов [37]. Неспособность иммунной системы у таких пациентов эффективно бороться и элиминировать патогены часто приводит к развитию персистирующей первичной или вторичной инфекции из-за ослабленного адаптивного иммунного ответа. В иммуносупрессивной фазе развития заболевания происходит обеднение каждой субпопуляции лимфоцитов (за исключением регуляторных Т-клеток, Treg). Степень лимфоцитопении коррелирует с развитием ИСОМП и (или) летальностью в течение 28 сут [38]. Важно отметить, что у пациентов ОРИТ затяжная лимфоцитопения связана с наличием инфекционных осложнений [39], при этом данный показатель является более информативным предиктором бактериемии, чем содержание С-реактивного белка и количество лейкоцитов в крови.

С помощью метода проточной цитометрии зарегистрировано значительное снижение количества циркулирующих NK-клеток у пациентов с тяжелой травмой, сепсисом, а их длительное снижение коррелировало с увеличением смертности [40]. Кроме того, обнаружено снижение цитотоксичности и антителозависимой цитотоксичности NK-клеток при сепсисе [41]. У септических пациентов также определяется снижение циркулирующих мукозно-ассоциированных инвариантных Т-лимфоцитов (MAIT) [42], при этом стойкое снижение MAIT коррелирует с последующим развитием ИСОМП. Значительное снижение относительного содержания γδТ-лимфоцитов с преобладанием субпопуляции непролиферирующих γδТ-лимфоцитов зарегистрировано у пациентов с сепсисом [43].

У пациентов с индуцированной иммуносупрес-

сией происходят количественные и функциональные изменения Т-лимфоцитов, а именно: активация апоптоза, анергия и истощение, увеличение доли Treg. Рассмотрим каждое из этих изменений отдельно.

Одна из причин лимфоцитопении при иммуносупрессии связана с гибелью Т- и В-лимфоцитов путем апоптоза. Представлены свидетельства снижения количества циркулирующих и тканевых резидентных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов при сепсисе [44].

РЕЦЕПТОР ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ 1 (PD-1) И ЕГО ЛИГАНД (PD-L1) В РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА ИММУННЫХ КЛЕТОК ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

Важный механизм усиления апоптотической гибели клеток связан с повышением экспрессии рецептора программируемой клеточной смерти 1 (PD-1) и его лиганда (PD-L1). PD-1 является отрицательной коингибирующей молекулой, которую экспрессируют лимфоциты, миелоидные клетки и DC. В физиологических условиях PD-1 участвует в регуляции иммунитета посредством предотвращения активации Т-лимфоцитов, что снижает аутоиммунность и повышает аутоотолерантность. Ингибирующий эффект PD-1 осуществляется через стимуляцию апоптоза антигенспецифичных Т-лимфоцитов в лимфатических узлах и снижении апоптоза регуляторных Т-лимфоцитов. Основным лиганд PD-1 (PD-L1) экспрессируют эпителиальные, эндотелиальные клетки и антигенпрезентирующие клетки (APCs) [45]. С помощью проточной цитометрии показано, что у пациентов с септическим шоком «драматически» повышается экспрессия PD-1 на Т-лимфоцитах и PD-L1 на моноцитах, что приводит к ускоренному апоптозу лимфоцитов всех основных субпопуляций [46]. Макрофаги также экспрессируют более высокий уровень PD-1 во время сепсиса, что связано с дисфункцией этих клеток и снижением микробного клиренса [47].

Гиперэкспрессия PD-1 и PD-L1 на иммунных клетках приводит к их дезактивации и ускорению апоптотической гибели, что обуславливает формирование и развитие иммуносупрессии при сепсисе и SIRS [48]. В клиническом исследовании повышение экспрессии PD-1 и PD-L1 на CD4+ Т-лимфоцитах наблюдалось в первые 5 сут госпитализации у пациентов с сепсисом и тяжелой травмой по сравнению со здоровыми донорами, уровень экспрессии PD-1 и PD-L1 коррелировал

со снижением стимулированной пролиферативной активности лимфоцитов и увеличением концентрации IL-10 (антивоспалительного цитокина) в крови [49].

Помимо прямого апоптотического эффекта молекул PD-1 и PD-L1 на Т-лимфоциты возникает опосредованное влияние через снижение количества антигенпрезентирующих DC. Антигенпрезентирующие клетки активируют CD4+ Т-лимфоциты, которые в ответ пролиферируют (клональная экспансия – основа эффективного адаптивного иммунного ответа) и дифференцируются в различные линии Т-лимфоцитов-хелперов (Th) – Th1, Th2 и Th17. Дефицит DC опосредует подавление процесса клональной экспансии, что в условиях прямого апоптотического влияния PD-1/PD-L1 приводит к выраженному снижению количества Т- и В-лимфоцитов [50].

Важная роль PD-1 и PD-L1 в патогенезе индуцированной иммуносупрессии подтверждается в экспериментальных и клинических исследованиях корреляцией уровня экспрессии данных молекул на поверхности иммунных клеток и развитием инфекционных осложнений и неблагоприятным исходом. Так, высокий уровень экспрессии PD-L1 на нейтрофилах коррелирует с повышением содержания про- и антивоспалительных цитокинов в крови и неблагоприятным исходом септического процесса [51]. Зарегистрирована связь между повышением экспрессии PD-1 на моноцитах у пациентов с септическим шоком и смертностью, а также риском развития вторичных нозокомиальных инфекций. Аналогично, увеличение PD-1 и PD-L1 на Th коррелирует с повышением числа случаев вторичных нозокомиальных инфекций и смертности после септического шока и тяжелой травмы [52].

КАЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ

У пациентов с сепсисом помимо снижения количества CD4+ Т-лимфоцитов отмечается одновременное уменьшение продукции цитокинов и экспрессии факторов транскрипции в популяциях Th1 и Th2 (T-bet для Th1-клеток, GATA3 для Th2-клеток) [53]. Эти процессы связаны с анергией и истощением Т-лимфоцитов. Понятие «истощение» введено А.Ж. Zajac (1998) для определения чрезмерно выраженных нарушений эффекторных функций Т-клеток [54]. Дисрегуляция функций Т-клеток обнаружена у пациентов с неонатальным и педиатрическим сепсисом, у пациентов ОРИТ с геморрагическим шоком и тяжелыми повреждениями тканей и далее индуцированной иммуносупрессией [55].

УВЕЛИЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА TREG

Важной особенностью дисфункции Т-лимфоцитов при индуцированной иммуносупрессии является повышение относительного количества циркулирующих лимфоцитов субпопуляции Treg (Т-клетки с регуляторными свойствами). Это явление было изначально описано у пациентов с септическим шоком [56]. Treg функционируют преимущественно в месте воспаления, где они модулируют иммунную реакцию через три основных механизма: прямой киллинг цитотоксических клеток, ингибирование продукции цитокинов цитотоксическими клетками и прямой секрецией иммуномодулирующих противовоспалительных цитокинов, таких как TGF β и IL-10 [57]. В работе К. Chen и соавт. (2015) показано, что повышение числа Treg наблюдалось сразу после шока, но сохранялось только у пациентов с неблагоприятным исходом. Один из механизмов связан с устойчивостью Treg к сепсис-индуцированному апоптозу по сравнению с другими эффекторными Т-клетками. Содержание Treg в крови у пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии может рассматриваться как прогностический маркер развития септических осложнений и неблагоприятного исхода [58].

Таким образом, относительное содержание Treg и уровень экспрессии CD39 на Treg заслуживают дальнейшего детального изучения и могут оказаться весьма полезными показателями при диагностике индуцированной иммуносупрес-

сии при SIRS и сепсисе. Однако для получения корректных результатов в многоцентровом исследовании необходима стандартизация подходов к фенотипированию Treg, поскольку используют различные протоколы окрасок и стратегии гейтирования (CD4+CD25+; CD4+CD25+CD127-; CD4+FOXP3+ и т.д.).

В- и Т-лимфоцитарный аттенуатор (В- and T-lymphocyte attenuator – BTLA) и цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4 (CTCTLA-4)

Как уже говорилось ранее, дисфункция Т-лимфоцитов может способствовать индуцированной иммуносупрессии и смертности. BTLA и его лиганд экспрессируют широкий спектр клеток, включая Т- и В-лимфоциты. BTLA представляет собой коингибирующий рецептор, который ингибирует CD4+ Т-клеточные и В-клеточные функции, а также подавляет сигнализацию в CD4+ Т-клетках, направленную на их выживание. В крови септических пациентов относительное содержание BTLA+/CD4+ лимфоцитов значительно выше по сравнению с несептическими пациентами ОРИТ и ассоциировалось с последующим развитием вторичной инфекции. CTLA-4 при взаимодействии с CD80 или CD86 является еще одним ингибирующим регулятором ранних стадий активации и пролиферации Т-клеток. Показано, что CTLA-4 является важным ингибитором функциональной активности иммунных клеток и его экспрессия повышается у пациентов с сепсисом [59] (табл.).

Т а б л и ц а

T a b l e

Основные иммунологические параметры, обладающие диагностической и/или прогностической значимостью, индуцированной повреждением иммуносупрессии у пациентов ОРИТ			
Main immunological parameters with diagnostic and prognostic value induced by impaired immunosuppression in patients at RICU			
Маркер Marker	Характер изменения Nature of change	Диагностическая значимость или основной механизм влияния на иммуносупрессию Diagnostic value or principle mechanism	Прогностическая значимость Prognostic value
CD10-/CD16low среди всех нейтрофилов, % Share of CD10-/CD16low in the total number of neutrophils, %	↑	Иммуносупрессия Immunosuppression	Смертность от сепсиса Death of sepsis
CD62L dim среди нейтрофилов, % Share of CD62L dim among neutro-phils, %	↑	Иммуносупрессия Immunosuppression	—
Экспрессия CD86 на моноцитах Expression of CD86 on mono-cytes	↓	Снижение антигенпрезентирующей функции Reduction of the antigen-presenting function	Длительное снижение в сочетании со снижением HLA DR – увеличение смертности и ИКОМП Long-term reduction in combination with a fall in HLA DR – increase in death rate and HAI

Продолжение табл.
End of table

Маркер Marker	Характер изменения Nature of change	Диагностическая значимость или основной механизм влияния на иммуносупрессию Diagnostic value or principle mechanism	Прогностическая значимость Prognostic value
Экспрессия HLA DR на моноцитах или содержание М-MDSC Expression of HLA DR on monocytes or the level of M-MDSC	↓ ↑	Снижение антигенпрезентирующей функции Reduction of the antigen-presenting function	Увеличение смертности и ИСОМП Increase in death rate and HAI
Экспрессия CX3CR1 на моноцитах Expression of CX3CR1 on monocytes	↓	Снижение хемотаксиса моноцитов Decrease in monocyte chemotaxis	Увеличение смертности Increase in death rate
Количество PMN-MDSC в крови Level of PMN-MDSC in blood	↑	Подавление функций Т-лимфоцитов Suppression of T-lymphocyte function	Увеличение смертности и ИСОМП Increase in death rate and HAI
Содержание DC в крови DC level	↓	Иммуносупрессия Immunosuppression	Увеличение смертности и ИСОМП Increase in death rate and HAI
Экспрессия HLA DR на DC Expression of HLA DR on DC	↓	Снижение антигенпрезентирующей функции Reduction of the antigen-presenting function	Развитие вторичных инфекций Development of secondary infections
Количество лимфоцитов в крови Number of lymphocytes in blood	↓	Иммуносупрессия Immunosuppression	Увеличение смертности и ИСОМП Increase in death rate and HAI
Экспрессия PD-1 на Т-лимфоцитах Expression of PD-1 on T-lymphocytes	↑	Усиление апоптоза Т-лимфоцитов Increase in apoptosis in T-lymphocytes	Увеличение смертности и ИСОМП Increase in death rate and HAI
Экспрессия PD-L1 на моноцитах Expression of PD-L1 on monocytes	↑	Ускорение апоптоза всех основных субпопуляций лимфоцитов Acceleration of apoptosis in all main lymphocyte subpopulations	Увеличение смертности и ИСОМП Increase in death rate and HAI
Количество Treg в крови Number of Treg in blood	↑	Иммуносупрессия Immunosuppression	Увеличение смертности и ИСОМП Increase in death rate and HAI
Экспрессия CD39+ на Treg Expresison of CD39+ on Treg	↑	Иммуносупрессия Immunosuppression	Дифференциальная диагностика сепсиса и SIRS, увеличение смертности Differential diagnosis of sepsis and SIRS, increase in death rate
Экспрессия BTLA и CTLA-4 на лимфоцитах Expression of BTLA and CTLA-4 on lymphocytes	↑	Подавление активации и пролиферации лимфоцитов Suppression of lymphocyte activation and proliferation	—

Примечание. ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии; ИСОМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи; SIRS – системный воспалительный ответ; ↑ – повышение; ↓ – снижение.

Note. RICU – Resuscitation and Intensive Care Unit; HAI – healthcare-associated infections; SIRS – systemic inflammatory response syndrome; ↑ – rise; ↓ – fall.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вышеизложенный материал доказывает универсальность основных механизмов, запускающих и поддерживающих иммуносупрессию для септических и стерильных системных воспалительных процессов, что объединяется термином

«индуцированная повреждением иммуносупрессия». Иммунологический мониторинг позволит разграничить быстро меняющиеся фазы прогрессирующего воспаления и тяжелой иммуносупрессии, что поможет улучшить результаты дифференцированной коррекции.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Medzhitov R., Schneider D.S., Soares M.P. Disease tolerance as a defense strategy. *Science*. 2012; 335: 936–941. DOI: 10.1126/science.1214935.
- Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Immunosuppression in sepsis: A novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13 (3): 260–268. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70001-X.
- Schefold J.C., Hasper D., Reinke P., Monneret G., Volk H.D. Consider delayed immunosuppression into the concept of sepsis. *Crit Care Med*. 2008; 36 (11): 3118. DOI: 10.1097/CCM.0b013e31818bdd8f.
- Ward N.S., Casserly B., Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin. Chest Med*. 2008; 29 (4): 617–625. DOI: 10.1016/j.ccm.2008.06.010.
- Monneret G., Venet F., Kullberg B.J., Netea M.G. ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections. *Med. Mycol*. 2011; 49 (Suppl. 1): S17–S23. DOI: 10.3109/13693786.2010.509744.
- Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: From cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol*. 2013; 13 (12): 862–874. DOI: 10.1038/nri3552.
- Delano M.J., Thayer T., Gabrilovich S., Kelly-Scumpia K.M., Winfield R.D., Scumpia P.O., Cuenca A.G., Warner E., Wallet S.M., Wallet M.A., O'Malley K.A., Ramphal R., Clare-Salzer M., Efron P.A., Mathews C.E., Moldawer L.L. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J. Immunol*. 2011; 186 (1): 195–202. DOI: 10.4049/jimmunol.1002104.
- Stephan F., Yang K., Tankovic J., Soussy C.J., Dhonneur G., Duvaldestin P., Brochard L., Brun-Buisson C., Harf A., Delclaux C. Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients. *Crit. Care Med*. 2002; 30 (2): 315–322.
- Marini O., Costa S., Bevilacqua D., Calzetti F., Tamassia N., Spina C., De Sabata D., Tinazzi E., Lunardi C., Scupoli M.T., Cavallini C., Zoratti E., Tinazzi I., Marchetta A., Vassanelli A., Cantini M., Gandini G., Ruzzenente A., Guglielmi A., Missale F., Vermi W., Tecchio C., Cassatella M.A., Scapini P. Mature CD10+ and immature CD10-neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood*. 2017; 129 (10): 1343–1356. DOI: 10.1182/blood-2016-04-713206.
- Orr Y., Taylor J.M., Bannon P.G., Geczy C., Kritharides L. Circulating CD10-/CD16 low neutrophils provide a quantitative index of active bone marrow neutrophil release. *Br. J. Haematol*. 2005; 131 (4): 508–519. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05794.x.
- Parihar A., Eubank T.D., Doseff A.I. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *J. Innate. Immun*. 2010; 2 (3): 204–215. DOI: 10.1159/000296507.
- Biswas S.K., Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009; 30 (10): 475–487. DOI: 10.1016/j.it.2009.07.009.
- Biswas S.K., Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: New mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009; 30 (10): 475–487. DOI: 10.1016/j.it.2009.07.009.
- Fumeaux T., Dufour J., Stern S., Pugin J. Immune monitoring of patients with septic shock by measurement of intraleukocyte cytokines. *Intensive Care Med*. 2004; 30 (11): 2028–2037. DOI: 10.1007/s00134-004-2429-8.
- Cavaillon J.M., Adrie C., Fitting C., Adib-Conquy M. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? *J. Endotoxin Research*. 2003; 9 (2): 101–107. DOI: 10.1179/096805103125001487.
- Lukaszewicz A.C., Grienay M., Resche-Rigon M., Pirracchio R., Faivre V., Boval B., Payen D. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit. Care Med*. 2009; 37 (10): 2746–2752. DOI: 10.1097/CCM.
- Delano M.J., Ward P.A. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J. Clin. Invest*. 2016; 126 (1): 23–31. DOI: 10.1172/JCI82224.
- Pachot A., Cazalis M.A., Venet F., Turrel F., Faudot C., Voirin N., Diasparra J., Bourgoin N., Poitevin F., Mougin B., Lepape A., Monneret G. Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. *J. Immunol*. 2008; 180 (9): 6421–6429. DOI: 10.4049/jimmunol.180.9.6421.
- Piani A., Hossle J.P., Birchler T., Siegrist C.A., Heumann D., Davies G., Loeliger S., Seger R., Lauener R.P. Expression of MHC class II molecules contributes to lipopolysaccharide responsiveness. *Eur. J. Immunol*. 2000; 30 (11): 3140–3146. DOI: 10.1002/1521-4141(200011)30:11<3140::AID-IMMU3140>3.0.CO;2-O.
- Wolk K., Docke W.D., von Baehr V., Volk H.D., Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood*. 2000; 96 (1): 218–223.
- Wolk K., Höflich C., Zuckermann-Becker H., Döcke W.D., Volk H.D., Sabat R. Reduced monocyte CD86 expression in postinflammatory immunodeficiency. *Crit. Care Med*. 2007; 35 (2): 458–467. DOI: 10.1097/01.CCM.0000254724.54515.2F.
- Venet F., Lukaszewicz A.C., Payen D., Hotchkiss R., Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: A rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr. Opin. Immunol*. 2013; 25 (4): 477–483. DOI: 10.1016/j.coi.2013.05.006.
- Chenouard A., Braudeau C., Cottion N., Bourgoin P., Salabert N., Roquilly A., Josien R., Joram N., Asehnoune K. HLA-DR expression in neonates after cardiac surgery under cardiopulmonary bypass: a pilot study. *Intensive Care Medicine Experimental*. 2018; 6 (1): 1. DOI: 10.1186/s40635-017-0166-x.

24. Fabienne V., Cour M., Demaret J., Guillaume M., Laurent A. Decreased Monocyte HLA-DR Expression in Patients After Non-Shockable out-of-Hospital Cardiac Arrest. *Shock*. 2016; 46 (1): 33–36. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000561.
25. Umansky V., Sevko A. Tumor microenvironment and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Microenviron*. 2013; 6 (2): 169–177. DOI: 10.1007/s12307-012-0126-7.
26. Bronte V., Brandau S., Chen S.-H., Colombo M.P., Frey A.B., Greten T.F., Mandruzzato S., Murray P.J., Ochoa A., Ostrand-Rosenberg S., Rodriguez P.C., Sica A., Umansky V., Vonderheide R.H., Gabrilovich D.I. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature communications*. 2016; 7: 12150. DOI: 10.1038/ncomms12150.
27. Koehn B.H., Apostolova P., Haverkamp J.M., Miller J.S., McCullar V., Tolar J., Munn D.H., Murphy W.J., Brickey W.J., Serody J.S., Gabrilovich D.I., Bronte V., Murray P.J., Ting J.P., Zeiser R., Blazar B.R. GVHD-associated, inflammasome-mediated loss of function in adoptively transferred myeloid-derived suppressor cells. *Blood*. 2015; 126 (13): 1621–1628. DOI: 10.1182/blood-2015-03-634691.
28. Uhel F., Azzaoui I., Grégoire M., Pangault C., Dulong J., Tadić J.M., Gacouin A., Camus C., Cynober L., Fest T., Le Tulzo Y., Roussel M., Tarte K. Early expansion of circulating granulocytic myeloid-derived suppressor cells predicts development of nosocomial infections in septic patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2017; 196 (3): 315–327. DOI: 10.1164/rccm.201606-1143OC.
29. Gey A., Tadić J.M., Caumont-Prim A., Hauw-Berlemont C., Cynober L., Fagon J.Y., Terme M., Diehl J.L., Delclaux C., Tartour E. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells inversely correlate with plasma arginine and overall survival in critically ill patients. *Clin. Exp. Immunol*. 2015; 180 (2): 280–288. DOI: 10.1111/cei.12567.
30. Tadić J.M., Cynober L., Peigne V., Caumont-Prim A., Neveux N., Gey A., Guerot E., Diehl J.L., Fagon J.Y., Tartour E., Delclaux C. Arginine administration to critically ill patients with a low nitric oxide fraction in the airways: a pilot study. *Intensive Care Med*. 2013; 39 (9): 1663–1665. DOI: 10.1007/s00134-013-2984-y.
31. Steinman R.M., Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2006; 311: 17–58.
32. Riccardi F., Della Porta M.G., Rovati B., Casazza A., Radolovich D., De Amici M., Danova M., Langer M. Flow cytometric analysis of peripheral blood dendritic cells in patients with severe sepsis. *Cytometry B Clin. Cytom*. 2011; 80: 1421. DOI: 10.1002/cyto.b.20540.
33. Guisset O., Dilhuydy M.S., Thiebaut R., Lefevre J., Camou F., Sarrat A., Gabinski C., Moreau J.F., Blanco P. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med*. 2007; 33 (1): 148–152. DOI: 10.1007/s00134-006-0436-7.
34. Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Swanson P.E., Grayson M.H., Osborne D.F., Wagner T.H., Cobb J.P., Coopersmith C., Karl I.E. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J. Immunol*. 2002; 168 (5): 2493–2500. DOI: 10.4049/jimmunol.168.5.2493.
35. Pastille E., Didovic S., Brauckmann D., Rani M., Agrawal H., Schade F.U., Zhang Y., Flohe S.B. Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. *J. Immunol*. 2011; 186 (2): 977986. DOI: 10.4049/jimmunol.1001147.
36. Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol*. 2013; 13 (12): 862–874. DOI: 10.1038/nri3552.
37. Adrie C., Lugosi M., Sonnevile R., Souweine B., Ruckly S., Cartier J.C., Garrouste-Orgeas M., Schwebel C., Timsit J.F. OUTCOMEREA study group. Persistent lymphopenia is a risk factor for ICU-acquired infections and for death in ICU patients with sustained hypotension at admission. *Annals of Intensive Care*. 2017; 7: 30. DOI: 10.1186/s13613-017-0242-0.
38. Inoue S., Suzuki-Utsunomiya K., Okada Y., Taira T., Iida Y., Miura N., Tsuji T., Yamagiwa T., Morita S., Chiba T., Sato T., Inokuchi S. Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. *Crit. Care Med*. 2013; 41 (3): 810–819. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318274645f.
39. De Jager C.P.C., van Wijk P.T.L., Mathoera R.B., de Jongh-Leuvenink J., van der Poll T., Wever P.C. Lymphocytopenia and neutrophil-lymphocyte count ratio predict bacteremia better than conventional infection markers in an emergency care unit. *Crit. Care*. 2010; 14 (5): R192. DOI: 10.1186/cc9309.
40. Forel J.-M., Chiche L., Thomas G., Mancini J., Farnarier C., Cognet C., Guervilly C., Daumas A., Vély F., Xéridat F., Vivier E., Papazian L. Phenotype and functions of natural killer cells in critically-ill septic patients. *PLoS One*. 2012; 7(12): e50446. DOI: 10.1371/journal.pone.0050446.
41. Souza-Fonseca-Guimaraes F., Parlato M., Fitting C., Cavaillon J.M., Adib-Conquy M. NK cell tolerance to TLR agonists mediated by regulatory T cells after polymicrobial sepsis. *J. Immunol*. 2012; 188 (12): 5850–5858. DOI: 10.4049/jimmunol.1103616.
42. Grimaldi D., Le Bourhis L., Sauneuf B., Dechartres A., Rousseau C., Ouaz F., Milder M., Louis D., Chiche J.D., Mira J.P., Lantz O., Pène F. Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections. *Intensive Care Med*. 2014; 40 (2): 192–201. DOI: 10.1007/s00134-013-3163-x.
43. Venet F., Bohe J., Debard A.L., Bienvenu J., Lepape A., Monneret G. Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit Care Med*. 2005; 33 (12): 2836–2840. DOI: 10.1097/01.CCM.0000189745.66585.AE.

44. Hotchkiss R.S., Nicholson D.W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6 (11): 813–822. DOI: 10.1038/nri1943.
45. Chen L., Flies D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13 (4): 227–242. DOI: 10.1038/nri3405.
46. Zhang Y., Li J., Lou J., Zhou Y., Bo L., Zhu J., Zhu K., Wan X., Cai Z., Deng X. Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit. Care.* 2011; 15 (1): R70. DOI: 10.1186/cc10059.
47. Huang X., Venet F., Wang Y.L., Lepape A., Yuan Z., Chen Y., Swan R., Kherouf H., Monneret G., Chung C.S., Ayala A. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2009; 106 (15): 6303–6308. DOI: 10.1073/pnas.0809422106.
48. Guignant C., Lepape A., Huang X., Kherouf H., Denis L., Poitevin F., Malcus C., Chéron A., Allaouchiche B., Gueyffier F., Ayala A., Monneret G., Venet F. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care.* 2011; 15 (2): R99. DOI: 10.1186/cc10112.
49. Day C.L., Kaufmann D.E., Kiepiela P., Brown J.A., Moodley E.S., Reddy S., Mackey E.W., Miller J.D., Leslie A.J., DePierres C., Mncube Z., Duraiswamy J., Zhu B., Eichbaum Q., Altfeld M., Wherry E.J., Coovadia H.M., Goulder P.J., Klennerman P., Ahmed R., Freeman G.J., Walker B.D. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006; 443 (7109): 350–354. DOI: 10.1038/nature05115.
50. Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Swanson P.E., Grayson M.H., Osborne D.F., Wagner T.H., Cobb J.P., Coopersmith C., Karl I.E. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J. Immunol.* 2002; 168 (5): 2493–2500. DOI: 10.4049/jimmunol.168.5.2493.
51. Huang X., Chen Y., Chung C.S., Yuan Z., Monaghan S.F., Wang F., Ayala A. Identification of B7-H1 as a novel mediator of the innate immune/proinflammatory response as well as a possible myeloid cell prognostic biomarker in sepsis. *J. Immunol.* 2014; 192 (3): 1091–1099. DOI: 10.4049/jimmunol.1302252.
52. Goyert S.M., Silver J. Editorial: PD-1, a new target for sepsis treatment: better late than never. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 88: 225–226. DOI: 10.1189/jlb.0410240.
53. Wick M., Kollig E., Muhr G., Koller M. The potential pattern of circulating lymphocytes TH1/TH2 is not altered after multiple injuries. *Arch. Surg.* 2000; 135 (11): 1309–1314. DOI: 10.1001/archsurg.135.11.1309.
54. Zajac A.J., Blattman J.N., Murali-Krishna K., Sourdive D.J.D., Suresh M., Altman J.D., Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 1998; 188 (12): 2205–2213. DOI: 10.1084/jem.188.12.2205.
55. Kuethe J.W., Mintz-Cole R., Johnson B.L. 3rd, Midura E.F., Caldwell C.C., Schneider B.S. Assessing the Immune Status of Critically Ill Trauma Patients by Flow Cytometry. *Nurs. Res.* 2014; 63 (6): 426–434. DOI: 10.1097/NNR.0000000000000061.
56. Monneret G., Debard A.L., Venet F., Bohe J., Hequet O., Biennu J., Lepape A. Marked elevation of human circulating CD41CD251 regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med.* 2003; 31 (7): 2068–2071. DOI: 10.1097/01.CCM.0000069345.78884.0F.
57. Kessel A., Bamberger E., Masalha M., Toubi E. The role of T regulatory cells in human sepsis. *J. Autoimmun.* 2009; 32 (3–4): 211–215. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.02.014.
58. Chen K., Zhou Q.X., Shan H.W., Li W.F., Lin Z.F. Prognostic value of CD4(1)CD25(1) Tregs as a valuable biomarker for patients with sepsis in ICU. *World. J. Emerg. Med.* 2015; 6 (1): 40–43. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2015.01.007.
59. Huang H., Xu R., Lin F., Bao C., Wang S., Ji C., Li K., Jin L., Mu J., Wang Y., Li L., Sun L., Xu B., Zhang Z., Wang F.S. High circulating CD39(+) regulatory T cells predict poor survival for sepsis patients. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 30: 57–63. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.11.006.

Сведения об авторах

Григорьев Евгений Валерьевич, д-р мед. наук, профессор, зам. директора по научной и лечебной работе, вед. науч. сотрудник, НИИ КПССЗ; зав. кафедрой анестезиологии и реаниматологии, КемГМУ, г. Кемерово. ORCID iD 0000-0002-3898-0740.

Матвеева Вера Геннадьевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточных технологий, НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID iD 0000-0002-4146-3373.

Шукевич Дмитрий Леонидович, д-р мед. наук, зав. лабораторией критических состояний, НИИ КПССЗ; профессор кафедры анестезиологии и реаниматологии, КемГМУ, г. Кемерово. ORCID iD 0000-0001-5708-2463.

Authors information

Grigoryev Evgeny V., DM, Professor, Deputy Director for Scientific and Clinical Affairs, RICICD; Head of the Anesthesiology and Critical Care Department, KemSMU, Kemerovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-3898-0740.

Matveeva Vera G., PhD, Senior Researcher, Laboratory for Cell Technologies, RICICD, Kemerovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4146-3373.

Shukevich Dmitry L., DM, Head of Laboratory for Critical Care, RICICD; Professor, Anesthesiology and Critical Care Department, KemSMU, Kemerovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5708-2463.

Радивилко Артем Сергеевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория критических состояний, НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID iD 0000-0001-8743-4466.

Великанова Елена Анатольевна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория клеточных технологий, НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID iD 0000-0002-1079-1956.

Ханова Марьям Юрисовна, лаборант-исследователь, лаборатория клеточных технологий, НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID iD 0000-0002-8826-9244.

(✉) **Григорьев Евгений Валерьевич**, e-mail: grigoriev@hotmai.com.

Radivilko Artem S., PhD, Senior Rresearcher, Laboratory for Critical Care, RICICD, Kemerovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-8743-4466.

Velikanova Elena A., PhD, Researcher, Laboratory for Cell Technologies, RICICD, Kemerovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1079-1956.

Khanova Maryam Yu., Researcher, Laboratory for Cell Technologies, RICICD, Kemerovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8826-9244.

(✉) **Grigoryev Evgeny V.**, e-mail: grigoriev@hotmai.com.

Поступила в редакцию 16.06.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Received 16.06.2018

Accepted 17.12.2018

Нейтрофильные гранулоциты: новые лица старых знакомых

Долгушин И.И.

Южно-Уральский государственный медицинский университет (ЮУГМУ)
Россия, 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64

РЕЗЮМЕ

За последние несколько десятилетий, благодаря использованию новых технологий, был значительно расширен спектр функциональных возможностей нейтрофильных гранулоцитов. Детально изучен их эффекторный потенциал в отношении инфекционных агентов, включающий фагоцитоз, продукцию активных форм кислорода и азота, дегрануляцию с высвобождением многочисленных ферментов и антимикробных пептидов, образование внеклеточных ловушек. Однако установлено, что многие из тех факторов, которые нейтрофилы используют для прямого уничтожения патогенов, оказывают регулирующее влияние в отношении других клеток иммунной системы и самих нейтрофилов. Кроме того, при активации нейтрофилы способны синтезировать ряд биологически активных молекул *de novo*. Традиционно считаясь индукторами воспалительной реакции, нейтрофилы демонстрируют способность параллельно включать механизмы, влияющие на ограничение и разрешение воспаления. Амбивалентное, как хелперное, так и супрессорное, воздействие нейтрофилов на клетки врожденного и адаптивного иммунитета свидетельствует об их важной иммунорегуляторной роли как в условиях гомеостаза, так и при различных видах патологии, в частности при развитии злокачественных опухолей.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, иммунорегуляторные функции, воспаление, адаптивный иммунитет, рак, тумор-ассоциированные нейтрофилы.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Долгушин И.И. Нейтрофильные гранулоциты: новые лица старых знакомых. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 30–37. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-30–37](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-30-37).

Neutrophil granulocytes: new faces of old acquaintances

Dolgushin I.I.

South-Ural State Medical University (SUSMU)
64, Vorovskogo Str., Chelyabinsk, 454092, Russian Federation

ABSTRACT

Over the past few decades, thanks to the use of new technologies, the spectrum of functional capabilities of neutrophil granulocytes has been significantly expanded. Their effector potential with respect to infectious agents, including phagocytosis, the production of active forms of oxygen and nitrogen, degranulation with the release of numerous enzymes and antimicrobial peptides, and the formation of extracellular traps were studied in detail. However, it has been found that many of the factors that neutrophils use to directly destroy pathogens have a regulating effect on other cells of the immune system and the neutrophils themselves. In addition, upon activation, neutrophils are capable of synthesizing a number of de novo biologically active molecules. Traditionally considered as inducers of an inflammatory reaction, neutrophils demonstrate the ability to simultaneously incorporate mechanisms that contribute to limiting and resolving inflammation. Ambivalent both helper and suppressor effects of neutrophils on cells of congenital and adaptive immunity testifies to their important immunoregulatory role both in homeostasis and various types of pathology, particularly in the development of malignant tumors.

Key words: neutrophil granulocytes, immunoregulatory functions, inflammation, adaptive immunity, cancer, tumor-associated neutrophils.

Conflict of interest. The author declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The author states that no funding for the study has been received.

For citation: Dolgushin I.I. Neutrophil granulocytes: new faces of old acquaintances. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 30–37. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-30-37>.

ВВЕДЕНИЕ

Со времен И.И. Мечникова принято считать, что основные функции нейтрофильных гранулоцитов – защита от инфекции и участие в развитии острого воспалительного ответа. Эти реакции обеспечиваются быстрой миграцией нейтрофилов в пораженную ткань, где они реализуют свои функции. В соответствии с классическими представлениями, нейтрофил характеризуется следующими признаками, отличающими его от других лейкоцитов. Во-первых, это короткоживущие клетки, срок их жизни в циркуляции составляет 8–12 ч, после чего они погибают. Во-вторых, нейтрофилы могут мигрировать только в одном направлении – из костного мозга в кровь, затем в сосуды, ткани и на поверхность слизистых оболочек. В-третьих, нейтрофилы – это клетки с весьма ограниченным и неизменным набором функций (фагоцитоз, секреторная дегрануляция, продукция активных форм кислорода и нетоз – образование ДНК-внеклеточных ловушек). В-четвертых, из-за низкой транскрипционной активности у нейтрофилов практически отсутствует способность к синтезу белковых медиаторов *de novo* [1, 2].

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ НЕЙТРОФИЛОВ

В последние годы традиционные представления об этих клетках были поставлены под сомне-

ния. Прежде всего, была пересмотрена модель жизненного цикла нейтрофилов. Установлено, что эти клетки генерируются в костном мозге из гранулоцитарно-макрофагальных предшественников и данный процесс регулируется микробиомом, несколькими факторами транскрипции и колоний-стимулирующим фактором. Вновь образующиеся нейтрофилы несколько дней хранятся в костном мозге, а затем выходят в циркуляцию. Выход обусловлен взаимодействием двух противоположных удерживающих и мобилирующих хемокинов CXCR4 и CXCR2. Выйдя в сосуды, нейтрофилы быстро меняют фенотип и функции через процесс старения, которым управляют продукты комменсальной микробиоты (PAMPs) и белок 88. Примерно через 12 ч нейтрофилы покидают кровоток, перемещаются в костный мозг, печень и селезенку, где фагоцитируются резидентными макрофагами в нишах ингибирования гемопоэза. Альтернативно нейтрофилы могут уходить в ткани или на поверхность слизистых оболочек для выполнения специфических для этих тканей функций [3].

В 2010 г. Janesh Pillay и его коллеги из Нидерландского медицинского университета опубликовали результаты исследований продолжительности жизни нейтрофилов, которые они получили с помощью необычного метода – перорального введения здоровым донорам-волонтерам тяжелой водородной воды с дейтерием с последующим

определением дейтерий-меченной ДНК в гранулоцитах. Эти результаты опровергли положение о том, что нейтрофилы – это короткоживущие клетки [4].

Установлено, что продолжительность жизни нейтрофилов в крови в среднем составляет не 8–12 ч, а 5,4 сут, т. е. примерно в 10 раз больше, чем предполагалось ранее. Математические расчеты показали, что такая продолжительность жизни уже достаточна для формирования у нейтрофилов фенотипического и функционального разнообразия, т. е. появления клеток с новыми функциями.

В течение последних 15 лет в связи с разработкой новых технологий изучения миграции нейтрофилов опровергнуто еще одно положение классической концепции о способности нейтрофилов мигрировать только в одном направлении – из костного мозга в сосуды, а затем в ткани. Для изучения миграции нейтрофилов *in vitro* используют микрофлюидные технологии. Они представляют собой капилляры, в которых создаются условия, близкие к кровеносным сосудам [5, 6].

Для исследования миграционной способности нейтрофилов *in vivo* широко применяют прижизненную микроскопию. При такой микроскопии хорошо видно перемещение нейтрофилов в сосудах, их миграцию через эндотелий в ткань и обратно [7, 8]. Использование новых методов позволило обнаружить у нейтрофильных гранулоцитов ранее неизвестное свойство – способность не только к прямой, но и к реверсивной миграции из тканей обратно в сосуды. Изучение механизма такой миграции позволило установить, что она контролируется особыми молекулами адгезии JAM-C. Обнаружено, что нейтрофилы в очаге воспаления активируются лейкотриеном B₄ и высвобождают из гранул фермент эластазу, который разрушает молекулы адгезии и позволяет нейтрофилам возвращаться обратно в кровоток [7, 8]. Исследование реверсивной миграции показало, что нейтрофилы, возвращающиеся из тканей в сосуды, приобретают новые свойства: у них усиливается продукция активных форм кислорода, замедляется апоптоз, и, как следствие, увеличивается продолжительность жизни [7, 8].

При исследовании миграции у нейтрофилов обнаружено еще одно важное и ранее неизвестное свойство, более присущее макрофагам и дендритным клеткам. Оказалось, что при воспалении, индуцированном микробными патогенами, нейтрофилы могут мигрировать в дренирующие лимфатические узлы, где они приобретают активированный фенотип (CD11b^{hi}, CD62L^{low}, CXCR2^{low}) и

способность экспрессировать костимулирующие молекулы CD80 и CD86, т. е. выполнять антигенпредставляющую функцию. В результате обратной миграции нейтрофилы, по-видимому, могут не только передавать фагоцитированный ими антиген профессиональным антигенпредставляющим клеткам, но также транспортировать живые микроорганизмы из очага воспаления в сосуды, способствуя генерализации инфекции и развитию сепсиса [9].

В соответствии с классическим взглядом, зрелые нейтрофилы обладают ограниченной способностью синтезировать белки *de novo*. Недавние исследования механизмов транскрипции у этих клеток показали, что нейтрофилы действительно содержат в 10–20 раз меньше мРНК, чем другие лейкоциты. Однако, поскольку их много, общее влияние нейтрофильных цитокинов в воспалительном ответе может быть значительным. Установлено, что нейтрофилы продуцируют цитокины, принадлежащие к самым различным семействам, включая иммуnoreгуляторные, провоспалительные, противовоспалительные цитокины семейства фактора некроза опухоли (TNF), хемокины, ангиогенные и фиброгенные факторы. Это заставляет думать о том, что, вопреки традиционным представлениям, нейтрофилы, которые продуцируют такую богатую гамму медиаторов, могут обладать не только эффекторными, но и регуляторными функциями [10].

В последние годы действительно появились данные о том, что нейтрофилы могут оказывать как активирующее (хелперное), так и ингибирующее (супрессорное) влияние на разные субпопуляции иммунокомпетентных клеток (макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты) [11, 12]. По классическим канонам воспаления, нейтрофилы, мигрировавшие в очаг воспаления, активируются, выделяют хемокины и цитокины, привлекающие моноциты и макрофаги. Включаясь в воспалительный ответ, макрофаги в то же время образуют так называемые эктосомы, которые обладают противовоспалительными свойствами. Установлено также, что связываясь за счет фосфатидилсерина с мембраной макрофагов, а также секретируя интерлейкины (IL) 10 и 13, нейтрофилы могут перепрограммировать макрофаги из провоспалительного фенотипа M1 в сторону противовоспалительного фенотипа M2. Таким образом, нейтрофилы, инициируя острый воспалительный ответ, с самых ранних этапов подключают механизмы, вызывающие его ограничение.

На дендритные клетки нейтрофилы также могут оказывать амбивалентное действие.

В частности, индукция нейтрофилов паразитом *Toxoplasma gondii* усиливает их антигенпредставляющую функцию и Т-хелпер (Th) 1-зависимый иммунный ответ. В то же время при инвазии другими паразитами – лейшманиями, нейтрофилы угнетают функцию дендритных клеток [13].

ВЗАИМОСВЯЗЬ НЕЙТРОФИЛОВ И Т-ЛИМФОЦИТОВ

Важными с точки зрения долгосрочных последствий для организма являются взаимоотношения нейтрофилов с Т-лимфоцитами. Нейтрофилы могут транспортировать антигены из очага воспаления в регионарные лимфоузлы, экспрессировать костимулирующие молекулы и становиться потенциальными антигенпрезентирующими клетками для CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, т. е. участвовать в индукции Th1 и Th2 иммунного ответа [11].

В то же время нейтрофилы могут оказывать супрессорное действие на Т-клетки с помощью протеаз, расщепляющих важнейшие для активации Т-лимфоцитов IL-2 и рецепторы для IL-2 и IL-6; аргиназы, которая метаболизирует аргинин, имеющий решающее значение для пролиферации Т-клеток и продукции ими цитокинов. Недавно у нейтрофилов обнаружен необычный белок – белок программированной клеточной смерти (PDI), который запускает апоптоз активированных Т-клеток [11].

Регуляторное влияние нейтрофилов на В-лимфоциты также проявляется по-разному. В частности при инфекции, вызванной *S. aureus*, обнаружены нейтрофилы, которые, проникая в мозговое вещество дренирующих лимфоузлов, снижают продукцию иммуноглобулина (Ig) М В-клетками [12].

Нейтрофилы, попадающие не в лимфоузлы, а в маргинальную зону селезенки, наоборот, стимулируют Т-независимый иммунный ответ. Такие нейтрофилы, продуцирующие факторы (BAFF, APRIL, IL-21), ускоряющие созревание и дифференцировку В-лимфоцитов, сейчас принято называть «В-клеточные хелперы». В-клеточные хелперы появляются только постнатально после колонизации слизистых комменсальной микробиотой, которая усиливает выработку IL-10 и регулирует образование В-хелперов, но не из гранулоцитарных предшественников циркулирующих нейтрофилов.

По сравнению с «обычными» нейтрофилами В-клеточные хелперы, которые характеризуются повышенной экспрессией как стимулирующих, так и супрессорных молекул (IL-10, аргиназа, програнулин и другие), демонстрируют функцио-

нальную двойственность: они усиливают В-клеточный ответ на Т-независимые антигены и подавляют ответ на Т-зависимые антигены [12]. Нейтрофилы участвуют в развитии опухолевых заболеваний. Эти клетки могут вызывать как торможение роста опухоли, так и усиление роста и метастазирования опухоли. Сейчас не вызывает сомнений, что нейтрофилы играют важную роль как в торможении роста опухоли, так и в инициации, прогрессировании и метастазировании раковых клеток [14–16].

НЕЙТРОФИЛЫ И ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ

Известно, что нейтрофилы первыми мигрируют в опухоль уже на ранних стадиях болезни и становятся активными компонентами стромы. Их принято обозначать как тумор-ассоциированные нейтрофилы (TAN) и разделять на два типа. Первый тип – это клетки со зрелым фенотипом, обладающие противоопухолевой, иммуностимулирующей активностью, они тормозят рост опухоли. Второй тип – это клетки с незрелым фенотипом, обладающие проканцерогенной, иммуносупрессорной активностью, они стимулируют опухолевую прогрессию [14–16].

Установлено, что TAN при раке имеют определенный фенотип CD15^{hi}CD66b+CD11b+ – классические TAN. Однако в процессе опухолевой прогрессии такие нейтрофилы могут менять свои свойства и фенотип [17]. На ранней стадии развития опухоли (узел <3 см) в инфильтрате выявляются TAN с противоопухолевой активностью, по-видимому, сдерживающие рост опухоли. На поздних стадиях заболевания (узел >5–7 см) опухоль инфильтрируется нейтрофилами, в основном с проканцерогенным, супрессорным фенотипом [18].

Проканцерогенная активность нейтрофилов реализуется с помощью индуцированных опухолью иммуносупрессорных молекул:

- 1) аргиназы, ингибирующей противоопухолевый иммунный ответ;
- 2) активных форм кислорода, вызывающих повреждение ДНК и индуцирующих возникновение опухоли;
- 3) фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и других цитокинов, которые усиливают метастазирование.

Противоопухолевая активность нейтрофилов обеспечивается 1) с помощью TNFα, хемокинов, которые привлекают и активируют цитотоксические Т-лимфоциты, и за счет прямого цитотоксического эффекта на опухолевые клетки нейтрофильных внеклеточных ловушек. По нашим данным, нейтрофильные внеклеточные сети могут играть двойную роль: с одной стороны, убивать опухолевые клетки

(этот процесс принято называть сейчас иммуногенной клеточной гибелью), с другой – способствовать их метастазированию [19].

В ряде исследований установлено, что при наличии опухоли в крови увеличивается количество особых гранулоцитарных клеток (G-MDSC), которые характеризуются фенотипом CD15+CD16^{low} и обладают выраженными супрессорными свойствами [18]. В последние годы показано, что при выделении клеток из периферической крови на градиенте плотности фиколл-верографина у больных раком и аутоиммунными заболеваниями, ВИЧ-инфекцией определяется некоторое количество нейтрофилов, имеющих низкую плотность. По нашим данным, они обнаруживаются и в крови здоровых людей. Такие нейтрофилы в основном обладают провоспалительным фенотипом, повышенной способностью к спонтанному образованию ДНК-сетей (нетозу) и эндотелиотоксичностью [19].

Нейтрофилы, по-видимому, участвуют в развитии аутоиммунных и аутовоспалительных процессов. Известно, что активация нейтрофилов сопровождается индукцией фермента пептидил-аргинин-деиминазой 4 (PAD4), который, как известно, играет ключевую роль в нетозе – образовании внеклеточных сетей нейтрофилами. Однако экструзия фермента PAD4 в ткань приводит не только к деконденсации ядерного хроматина и нетозу, но и к цитруллинированию внутри- и внеклеточных белков. В результате в этих белках нормальная аминокислота аргинин преобразуется в ненормальную аминокислоту цитруллин, которая в естественных условиях не синтезируется [20]. Наличие остатков цитруллина в таких белках может превращать их в неоантигены и вовлекать в очаг воспаления дендритные миелоидные клетки, Т- и В-лимфоциты. Этот сценарий может функционировать как «инкубатор аутоиммунной презентации».

Действительно, сейчас уже установлено, что дендритные клетки легче загружаются продуктами нетоза, чем продуктами апоптоза и некроза клеток. Иммунизация дендритных клеток продуктами нетоза *in vitro* индуцирует образование аутоантител, тогда как апоптотический «мусор» таким свойством не обладает [21]. У больных с системной красной волчанкой продукты нетоза могут индуцировать у дендритных клеток синтез интерферона γ TLR-зависимым образом. Аналогичный процесс выявлен сейчас при псориазе и диабете I типа [21]. Еще одним важным усилителем воспалительного ответа может быть активация цитруллинированными продуктами внеклеточных ловушек нейтрофилов инфламмасомного

аппарата. Ловушки и, в частности кателицидин LL37 (белок нейтрофильных внеклеточных ловушек), могут активировать каспазу 1 – фермент инфламмасом, что, в свою очередь, приводит к высвобождению IL-1 β и IL-18 [21]. Данные механизмы работают при аутоиммунных и аутовоспалительных процессах, при которых под действием PAD4 образуются цитрулированные пептиды и к которым вырабатываются аутоантитела. Такие заболевания сейчас принято называть PAD4-зависимыми.

СТАРЕЮЩИЕ НЕЙТРОФИЛЫ

Помимо необычных маркеров нейтрофилов при раке и аутоиммунных заболеваниях сейчас вызывает большой интерес фенотип так называемых стареющих нейтрофилов. Оказалось, что в норме в покое циркулирующие нейтрофилы подвергаются фенотипическим изменениям в течение суток от момента их высвобождения из костного мозга до момента элиминации из кровотока. Этот естественный процесс и называется старением нейтрофилов. Отмечено, что в течение суток у нейтрофилов меняются экспрессия поверхностных маркеров CD11b^{low}CXCR4^{low}CD62L^{hi} на CD62L^{low}CD11b^{hi}CXCR4^{hi}, транскрипционные свойства, ядерная морфология, гранулярность и размеры клеток. Эти трансформации предшествуют ежедневному клиренсу и гибели нейтрофилов в вечернее время [22].

Недавно установлена еще одна интересная особенность. У нейтрофилов процесс старения регулируется компонентами комменсальной микробиоты через TLR-рецепторы и белок 88. Физиологическая роль суточного старения пока не понятна, возможно, она отражает адаптацию врожденного иммунитета к изменяющейся вероятности заражения патогенами в разное время суток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейтрофилы обладают большой фенотипической пластичностью и, по-видимому, выполняют в иммунной системе роль своеобразного многофункционального центра регуляции воспалительного и адаптивного иммунного ответа. К сожалению, при оценке иммунного статуса пациентов сегодня ограничиваются, как правило, исследованием лишь нетоза и фагоцитарной функции нейтрофилов, поскольку до сих пор пока нет общепринятой фенотипической классификации этих клеток. В представленной ниже таблице систематизированы данные о некоторых фенотипах нейтрофилов, которые могут оказаться полезными в практической работе.

Фенотипы нейтрофильных гранулоцитов Phenotypes of neutrophil granulocytes	
Фенотип Phenotype	Функциональное свойство Functional feature
CD62L ^{dim} CD16b ^{right}	Иммуносупрессорные нейтрофилы. Ингибируют пролиферацию Т-лимфоцитов ROS-зависимым способом. Участвуют в развитии иммуносупрессии при остром системном воспалении (сепсисе) Immunosuppressor neutrophils. Inhibit proliferation of T-lymphocytes through ROS. Contribute to development of immunosuppression under sepsis
CD62L ^{low} CD11b ^{hi} CXCR4 ^{hi}	Стареющие нейтрофилы. Обладают повышенной способностью к миграции, фагоцитозу и формированию НВА (провоспалительный потенциал) Aging neutrophils. Have increased capacity for migration, phagocytosis and formation of NETs (pro-inflammatory potential)
CD49d+VEGFR1 ^{hi} CXCR4 ^{hi}	Ангиогенные нейтрофилы. Продуцируют MMP9 и способствуют ангиогенезу в тканях при гипоксии и, по-видимому, при раке Angiogenic neutrophils. Produce MMP9 and contribute to angiogenesis in tissues under hypoxia and, apparently, under cancer.
CD49d+	Нейтрофилы, связанные с атопией (аллергией): выявляются у людей с атопией в назальном содержимом и в крови (6,6%); без атопии (1,6%) Neutrophils associated with atopy (allergy): are detected in patients with atopy in nasal mucus and blood (6.6%) and in individuals without atopy (1.6%)
TCR	Вариант TCRαβ. Экспрессируют 3–5% циркулирующих нейтрофилов. Активация этого рецептора усиливает секрецию IL-8 и подавляет апоптоз нейтрофилов Subtype TCRαβ. Express 3-5% of circulating neutrophils. Activation of this receptor increases secretion of IL-8 and suppresses apoptosis in neutrophils.
ICAM-1 (CD54)	Поверхностный гликопротеин. Является молекулой адгезии из суперсемейства иммуноглобулинов Surface glycoprotein. Is an adhesion molecule from the immunoglobulins superfamily.
ICAM-1 ^{low} CXCR1 ^{hi}	В норме – низкая экспрессия на циркулирующих нейтрофилах. Повышается при хроническом системном воспалении In normal conditions – low expression on circulating neutrophils. The level elevates under chronic systemic inflammation.
ICAM-1 ^{hi} CXCR1 ^{low}	Обратно мигрирующие нейтрофилы Reverse migrated neutrophils
CD11b ^{hi} , CD62L ^{low} , CXCR2 ^{low}	Фенотип активированных нейтрофилов Phenotype of activated neutrophils
CD177+ (NB1+)	Поверхностный гликопротеин, молекула адгезии. Экспрессируют около 50% циркулирующих нейтрофилов. Участвует в трансэндотелиальной миграции. Количество нейтрофилов с фенотипом CD177+ увеличивается при воспалительных и инфекционных заболеваниях Surface glycoprotein, adhesion molecule. Express about 50% of circulating neutrophils. Take part in transendothelial migration. The number of neutrophils with the CD177+ phenotype rises under inflammatory and infectious diseases.
CD177+mPR3+	Может коэкспрессироваться с mPR3. Количество CD177+mPR3+ увеличивается при ANCA-зависимом васкулите. May coexpress with mPR3. The number of CD177+mPR3+ rises under ANCA-associated vasculitis.
OLFM4+ (олфактомедин-4)	Гликопротеин специфических гранул. Выявляется у 20–25% циркулирующих нейтрофилов. Является негативным регулятором бактерицидности нейтрофилов, подавляя активацию катепсина G, эластазы и протеиназы 3, а значит – внутриклеточный киллинг. Определяется в составе НВА Glycoprotein in specific granules. Detected in 20–25% of circulating neutrophils. A negative regulator of the bactericidal activity of neutrophils, suppresses activation of cathepsin G, elastase and proteinase 3, ensuring intracellular killing. Identified as part of NETs.

Продолжение табл.

End of table

Фенотип Phenotype	Функциональное свойство Functional feature
LDN	Нейтрофилы низкой плотности. У здоровых доноров – около 17%. Гетерогенная популяция, в которой есть и иммуносупрессорные (G-MDSC) клетки (повышаются при раке) и провоспалительные клетки (повышаются при АИЗ) Low density neutrophils. In healthy donors, they account for about 17%. Heterogenic population that includes immunosuppressor (G-MDSC) cells (their number rises under cancer) and anti-inflammatory cells (their number rises under AID).

Примечание. НВА – нейтрофильные внеклеточные ловушки; АИЗ – аутоиммунные заболевания.

Note. NETs – neutrophil extracellular traps. AID – autoimmune diseases.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Куликов В.А., Гребенников И.Н. Резольвины, протектины и марецины: новые медиаторы воспаления. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2012; 11 (1): 25–30. [Kulikov V. A., Grebennikov I. N. Of the resolvent, protectins and maresins as: new mediators of inflammation. *Vestnik of Vitebsk state medical University*. 2012; 11 (1): 25–30. (in Russ.)].
- Kruger P., Saffarzadeh M., Weber A.N., Rieber N., Rad-sak M., von Bernuth H., Benarafa C., Roos D., Skokowa J., Hartl D. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*. 2015; 11 (3): e1004651. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004651.
- McDonald B., Pittman K., Menezes G.B., Hirota S.A., Slaba I., Waterhouse C.C., Beck P.L., Muruve D.A., Kubers P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 2010; 330 (6002): 362–366.
- Pillay J., Kamp V.M., van Hoffen E., Visser T., Tak T., Lammers J.W., Ulfman L.H., Leenen L.P., Pickkers P., Koenderman L. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012; 122 (1): 327–336.
- Colom B., Bodkin J.V., Beyrau M., Woodfin A., Ody C., Rourke C., Chavakis T., Brohi K., Imhof B.A., Nourshargh S. Leukotriene B₄-neutrophil elastase axis drives neutrophil reverse transendothelial cell migration *in vivo*. *Immunity*. 2015; 42 (6): 1075–1086. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.05.010
- Woodfin A., Voisin M.B., Beyrau M., Colom B., Caille D., Diapouli F.M., Nash G.B., Chavakis T., Albelda S.M., Rainger G.E., Meda P., Imhof B.A., Nourshargh S. The junctional adhesion molecule (JAM-C) regulates polarized transendothelial migration of neutrophils *in vivo*. *Nature Immunology*. 2011; 12 (8): 761–769. DOI: 10.1038/ni.2062.
- Jenne C.N., Liao S., Singh B. Neu-trophils: multitasking first responders of immunity and tissue homeostasis. *Cell and Tissue Research*. 2018; 371 (3): 395–397. DOI: 10.1007/s00441-018-2802-5.
- Lopez-Lago M.A., Posner S., Thodima V.J., Molina A.M., Motzer R.J., Chaganti R.S. Neutrophil chemokines secreted by tumor cells mount a lung antimetastatic response during renal cell carcinoma progression. *Oncogene*. 2013; 32 (14): 1752–1760.
- De Kleijn S., Langereis J.D., Leentjens J., Kox M., Netea M.G., Koenderman L., Ferwerda G., Pickkers P., Hermans P.W. IFN- γ -stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through ex-pression of PD-L1. *PLoS ONE*. 2013; (8): e72249.
- Kruger P., Saffarzadeh M., Weber A.N., Rieber N., Rad-sak M., von Bernuth H., Benarafa C., Roos D., Skokowa J., Hartl D. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*. 2015; 11 (3): e1004651. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004651.
- Cross A., Bucknall R.C., Cassatella M.A., Edwards S.W., Moots R.J. Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatology*. 2003; 48, (10): 2796–2806.
- Puga I., Cols M., Barra C.M., He B., Cassis L., Gentile M., Comerma L., Chorny A., Shan M., Xu W., Magri G., Knowles D.M., Tam W., Chiu A., Bussell J.B., Serrano S., Lorente J.A., Bellosillo B., Lloreta J., Juanpere N., Alameda F., Bary T., de Heredia C.D., Torán N., Catala A., Torrealadell M., Fortuny C., Cush V., Carreras C., Diaz G.A., Blander J.M., Farber C.M., Silvestri G., Cunningham-Rundles C., Calvillo M., Dufour C., Notarangelo L.D., Lougaris V., Plebani A., Casanova J.L., Ganai S.C., Diefenbach A., Arystegui J.I., Juan M., Yagüe J., Mah-laoui N., Donadieu J., Chen K., Cerutti A. B cell-helper neutrophils stimulate immunoglobulin diversification and production in the marginal zone of the spleen. *Nature Immunology*. 2011; 13 (2): 170–180. DOI: 10.1038/ni.2194.
- Valladeau J., Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Seminars in Immunology*. 2005;17 (4): 273–283.
- Nicolás-Ávila J.Á., Adrover J.M., Hidalgo A. Neutrophils in homeostasis, immunity, and cancer. *Immunity*. 2017; 46 (1): 15–28. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.12.012.
- Powell D.R., Huttenlocher A. Neu-trophils in the tumor microenvironment. *Trends in Immunology*. 2016; 37 (1): 41–52. DOI: 10.1016/j.it.2015.11.008.
- Shaul M.E., Fridlender Z.G. Cancer related circulating and tumor-associated neutrophils – subtypes, sources and function. *The FEBS Journal*. 2018. DOI: 10.1111/febs.14524.

17. Fridlender Z.G., Albelda S.M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*. 2012; 33 (5): 949–955. DOI: 10.1093/carcin/bgs123.
18. Singhal S., Bhojnagarwala P.S., O'Brien S., Moon E.K., Garfall A.L., Rao A.S., Quatromoni J.G., Stephen T.L., Litzky L., Deshpande C., Feldman M.D., Hancock W.W., Conejo-Garcia J.R., Albelda S.M., Eruslanov E.B. Origin and role of a subset of tumor-associated neutrophils with antigen-presenting cell features in early-stage human lung cancer. *Cancer Cell*. 2016; 30 (1): 120–135. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.06.001.
19. Семенова А.Б., Казачков Е.А., Долгушин И.И., Важеннин А.В. Формирование нейтрофильными гранулоцитами сетей внеклеточной ДНК как дополнительный диагностический критерий степени злокачественности карцином молочной железы. *Уральский медицинский журнал*. 2016; 3 (136): 70–73. [Semyonova A.B., Kazachkov E.L., Dolgushin I.E., Vazhenin A.V. formation of extracellular DNA networks by neutrophils as an additional diagnostic criterion of the degree of malignancy of the breast cancer. *Ural Medical Journal*. 2016; 3 (136): 70–73. (in Russ.)].
20. Park S.A., Hyun Y.M. Neutrophil ex-travasation cascade: what can we learn from two-photon intravital imaging? *Immune Network*. 2016; 16 (6): 317–321.
21. Grayson P.C., Kaplan M. At the Bench: Neutrophils extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. *J. Leukoc Biol*. 2016; 99 (2): 253–264. DOI: 10.1189/jlb.5BT0615-247R.
22. Escors D., Kochan G. Myeloid-derived suppressor cells and their “inconvenient” plasticity. *Journal of Immunological Sciences*. 2018; 2 (2): 42–47.

Сведения об авторе

Долгушин Илья Ильич, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, президент ЮУГМУ, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, ЮУГМУ, г. Челябинск.

(✉) Долгушин Илья Ильич, e-mail: dol-ii@mail.ru.

Поступила в редакцию 11.10.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Author information

Dolgushin Ilia I., DM, Professor, Academician of RAS, President of SUSMU, Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, Chelyabinsk, Russian Federation.

(✉) Dolgushin Ilia I., e-mail: dol-ii@mail.ru.

Received 11.10.2018
Accepted 17.12.2018

Цитокины, обратная генетика и антицитокиновая терапия

Друцкая М.С.^{1,2}, Губернаторова Е.О.^{1,2}, Горшкова Е.А.^{1,2},
Атретханы К.-С.Н.^{1,2}, Носенко М.А.^{1,2}, Гоголева В.С.^{1,2},
Намаканова О.А.^{1,2}, Зварцев Р.В.¹, Круглов А.А.^{1,2}, Недоспасов С.А.^{1,2}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)
Россия, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 32

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (МГУ им. М.В. Ломоносова)
Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1

РЕЗЮМЕ

Цитокины – молекулярный язык коммуникаций между клетками, используемый как для поддержания гомеостаза организма (в том числе иммунной системы), так и при различных заболеваниях. Многие аспекты воспаления, аутоиммунных заболеваний и неоплазий связаны с действием цитокинов через специфические рецепторы. Фундаментальную научную проблему представляют установление новых физиологических функций «старых» цитокинов, понимание молекулярных и клеточных механизмов их работы в заболеваниях, поиск новых терапевтических мишеней и разработка инновационных подходов к антицитокиновой терапии. При оценке грандиозного успеха антицитокиновой терапии в лечении некоторых аутоиммунных заболеваний нельзя забывать о том, что, во-первых, это лечение не устраняет причины заболевания – аутореактивных Т-клеточных клонов, во-вторых, на нее отвечает менее половины пациентов, и, в-третьих, у нее есть серьезные побочные эффекты.

Ключевые слова: TNF, IL-6, мышинные модели, биспецифические антитела, коллаген-индуцированный артрит, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, астма, гуманизированные мыши.

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

Источник финансирования. Работа поддержана грантом РНФ № 14-25-00160.

Благодарности. Авторы благодарят А.В. Туманова, Д.В. Купраша, Г.А. Ефимова, С.В. Тиллиба, С.И. Гривенникова, С.В. Козлова, И.А. Муфазалова, К.В. Корнеева, А.В. Дейкина, Д.М. Чудакова, В.В. Мохонова, И.А. Астраханцеву за содействие этому исследованию.

Для цитирования: Друцкая М.С., Губернаторова Е.О., Горшкова Е.А., Атретханы К.-С.Н., Носенко М.А., Гоголева В.С., Намаканова О.А., Зварцев Р.В., Круглов А.А., Недоспасов С.А. Цитокины, обратная генетика и антицитокиновая терапия. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 38–48. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-38-48>.

УДК 616-097:577.112:615.37

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-38-48>

Cytokines, reverse genetics and anti-cytokine therapy

Drutskaya M.S.^{1,2}, Gubernatorova E.O.^{1,2}, Gorshkova E.A.^{1,2}, Athertkhany K.-S.N.^{1,2},
Nosenko M.A.^{1,2}, Gogoleva V.S.^{1,2}, Namakanova O.A.^{1,2}, Zvartsev R.V.¹,
Kruglov A.A.^{1,2}, Nedospasov S.A.^{1,2}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (EIMB RAS)
32, Vavilov Str., Moscow, 119991, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University (LMSU)
1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

ABSTRACT

Cytokines comprise the molecular language of communication between the cells, which is needed to maintain the homeostatic functions of the body (including the immune system) and mediate various diseases. Many aspects of inflammation, autoimmune diseases and neoplasia are associated with cytokine signaling through specific receptors. The establishment of new physiological functions of “old” cytokines and understanding the molecular and cellular mechanisms of their involvement in disease pathogenesis, as well as the search for new therapeutic targets and development of innovative approaches to anti-cytokine therapy, present a fundamental problem. When assessing the tremendous success of anti-cytokine therapy in treatment of certain autoimmune diseases, we should not forget that (a) this treatment does not eliminate the causes of the disease: autoreactive T-cell clones; and that (b) less than half of the patients respond to this therapy; and that (c) anti-cytokine therapy has serious side effects.

Key words: TNF, IL-6, mouse models, bispecific antibodies, collagen-induced arthritis, experimental autoimmune encephalomyelitis, asthma, humanized mice.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Source of funding. This study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 14-25-00160.

Acknowledgements. The authors would like to thank Tumanov A.V., Kuprash D.V., Efimov G.A., Tillib S.V., Grivennikov S.I., Kozlov S.V., Muphazalov I.A., Korneev K.V., Deikin A.V., Chudakov D.M., Mokhonov V.V., and Astrakhantseva I.A. for their valuable contribution to the study.

For citation: Drutskaya M.S., Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Athertkhany K.-S.N., Nosenko M.A., Gogoleva V.S., Namakanova O.A., Zvartsev R.V., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. Cytokines, reverse genetics and anti-cytokine therapy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 38–48. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-38-48>.

ВВЕДЕНИЕ

Цитокины – это молекулярный язык межклеточного общения, с помощью которого клетки – продуценты цитокинов посылают сигналы клеткам, несущим соответствующие высокоаффинные рецепторы. Цитокины могут действовать дистанционно, подобно гормонам, но чаще действуют на клетки того же гистологического компартмента, в том числе и при прямом клеточном контакте. Последствиями цитокиновых сигналов могут стать активация, пролиферация, дифференциров-

ка, выживание или программируемая клеточная гибель, которая включает не только апоптоз, но и некроптоз. Отдельный подкласс цитокинов, называемый хемокинами, передает инструкции по миграции клеток в направлении источника молекулярного сигнала. По механизму передачи сигнала рецепторы хемокинов принципиально отличаются от рецепторов всех других цитокинов и возникли очень рано в филогенезе.

Вся работа иммунной системы в значительной степени регулируется цитокинами, которые часто относят к гуморальным факторам иммунитета.

При этом часть цитокинов может действовать и в трансмембранной форме, просто в этом случае потребуются непосредственное взаимодействие двух клеток, а механизмы передачи внутриклеточного сигнала в клетке, несущей рецептор, останутся теми же самыми.

Цитокинов в организме около 100, и большинство из них входят в семейства, которые передают сигнал через похожие по структуре рецепторы. Этим и объясняется сходство физиологических эффектов родственных цитокинов. Важно, что исследования, основанные на технологиях обратной генетики, а также фармакологическая блокировка индивидуальных цитокинов привели к пониманию того, что, несмотря на присутствие в организме родственных молекул, практически у каждого исследованного цитокина есть какие-то невырожденные функции, отобранные эволюцией. Это последнее обстоятельство нетривиально и представляет большой интерес как для фундаментальной науки, так и для ее клинических приложений.

Хотя природные функции большинства цитокинов направлены на поддержание гомеостаза разных систем организма (не только иммунной!), а также на защиту от неблагоприятных воздействий, в случае неправильной регуляции те же сигнальные каскады могут приводить к патологическим состояниям. В частности, провоспалительные цитокины: фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF), интерлейкин (IL) 1, IL-6, IL-17, интерферон гамма (IFN γ) и другие при некоторых заболеваниях оказываются факторами патогенеза. Поэтому генетическая или фармакологическая блокировка этих цитокинов в модельных организмах может способствовать терапевтическому эффекту. Антицитокиновая терапия многих заболеваний, впервые примененная в середине 1990-х гг. для блокировки TNF у больных ревматоидным артритом [1], прочно вошла в арсенал практикующих врачей, причем спектр как самих цитокинов, так и показаний, при которых применение антицитокиновой терапии обосновано, неуклонно расширяется. Однако до сих пор не решены две фундаментальные проблемы: во-первых, как добиться того, чтобы анти-TNF или анти-IL-6 терапия была эффективна для большинства пациентов с аутоиммунитетом, и, во-вторых, как добиться того, чтобы эта терапия не вызывала осложнений, связанных с реактивацией бактериальных инфекций, в частности латентного туберкулеза. Кроме того, антицитокиновая терапия вмешивается в механизмы иммунорегуляции, но никак не затрагивает первопри-

чины аутоиммунных заболеваний: образования в организме аутореактивных Т- или В-клеточных клонов.

Наша лаборатория является признанным экспертом и лидером в изучении таких цитокинов, как TNF и лимфотоксин (LT). В последние годы к ним добавился IL-6, и на очереди находятся и некоторые другие цитокины. Нами были созданы десятки уникальных мышинных моделей, позволяющих изучать как эффекты генетического дефицита цитокина, так и последствия его контролируемой сверхэкспрессии.

Одно из направлений в исследовании физиологических функций цитокинов состоит в соотношении их защитных и патогенных функций (в случае модельных заболеваний) с конкретными типами клеток-продуцентов. Эта парадигма сформировалась в течение последних 10–15 лет в процессе изучения одного из самых интересных и плейотропных цитокинов – TNF.

Наши исследования *in vivo* базируются, в первую очередь, на инновационной приборной базе в виде уникальных мышинных моделей с генетическими локусами, отредактированными для решения конкретных фундаментальных задач иммунологии [2–4]. На создание базы ушло более 20 лет (первая работа опубликована в 1997 г.) [5]. Многие из созданных нами мышей уникальны и используются десятками лабораторий мира. Это позволяет нам участвовать в исследованиях, проведение которых самостоятельно было бы затруднено из-за проблем со специфическими моделями заболеваний (например, инфекционными), отсутствия специального оборудования (например, установок для прижизненного имиджинга) или недостаточной научной экспертизы (например, в области нейробиологии и физиологии сердечно-сосудистой системы).

TNF, LT, РЕЦЕПТОРЫ TNF И АНТИ-TNF ТЕРАПИЯ

С использованием уникальных мышей, созданных с помощью технологий редактирования генома, были изучены особенности протекания экспериментальных заболеваний, таких как коллаген-индуцированный артрит, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ), экспериментальный колит, экспериментальные бактериальные инфекции, а также рак кожи и рак кишечника. В некоторых из этих моделей нами была впервые установлена патогенная роль TNF из ограниченного числа клеточных источников, в частности из миелоидных клеток [6, 7]. По крайней мере в двух моделях заболеваний –

коллаген-индуцированном артрите (рис. 1) и в экспериментальной туберкулезной инфекции –

TNF, продуцируемый Т-лимфоцитами, играл невырожденную защитную роль.

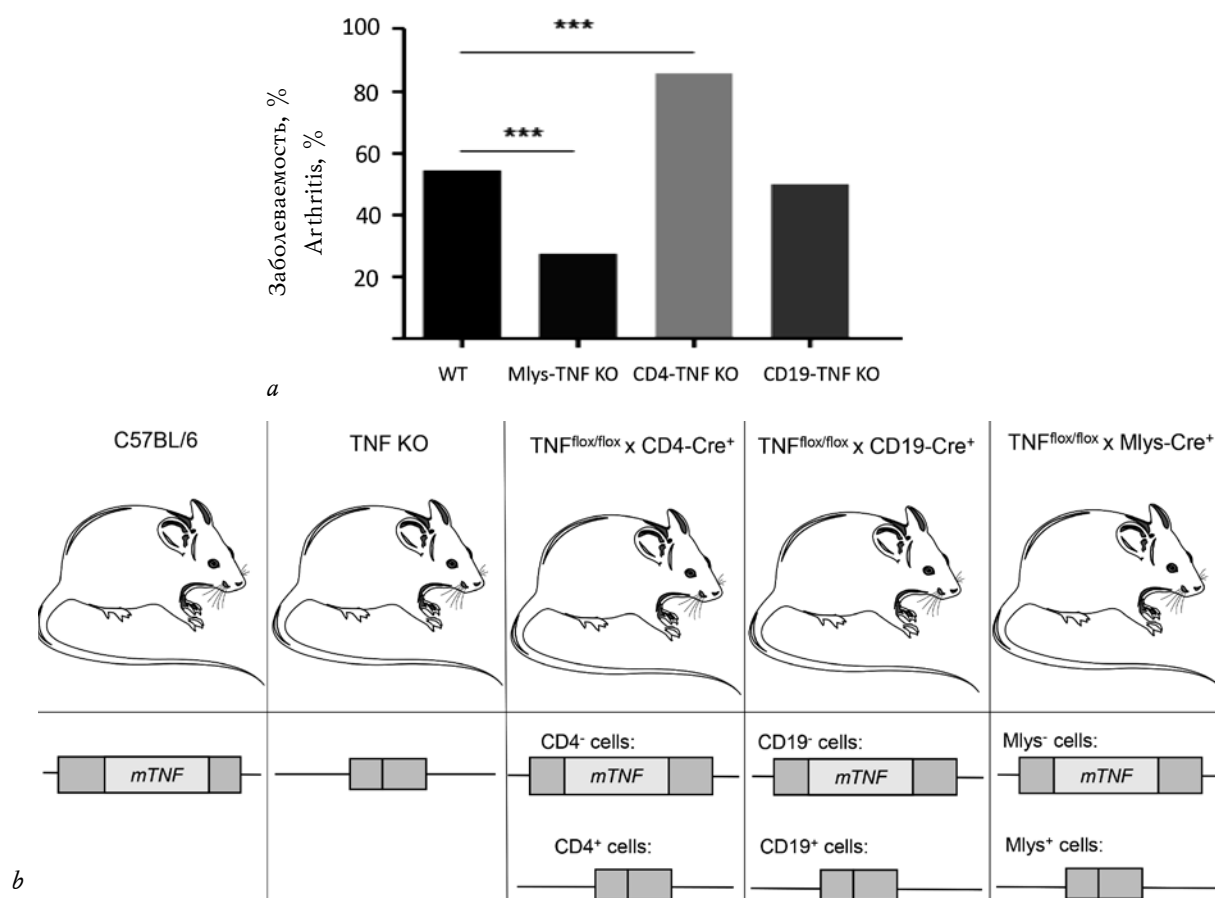


Рис. 1. Мыши с тканеспецифическим удалением TNF развивают воспаление различной степени тяжести в модели коллаген-индуцированного артрита: *a* – заболеваемость коллаген-индуцированным артритом. Мышей иммунизировали коллагеном в полном адьюванте Фрейнда с повышенным содержанием убитых микобактерий; *b* – схема получения панели мышей с полным и тканеспецифическими нокаутами гена *TNF*. Здесь и на рис. 3, 6, 7 данные представлены в виде среднего $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$

Fig. 1. Mice with tissue-specific inactivation of TNF develop inflammation of variable severity in the collagen-induced arthritis model: *a* – collagen-induced arthritis. The mice were immunized with collagen in complete Freund's adjuvant with the increased content of killed mycobacteria; *b* – schematic representation of a panel of mice with complete and tissue-specific knock-out of TNF. Here and in Fig. 3, 6 and 9, the data are presented as the mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$

Для получения панели мутантов использовали мышей, у которых ген *TNF* был фланкирован loxP-сайтами. Под действием рекомбиназы Cre этот участок гена удаляется, в результате чего нарушается экспрессия цитокина. Мышей с флосированным геном *TNF* ($TNF^{flax/flax}$) скрещивали с мышами, экспрессирующими Cre-рекомбиназу под различными промоторами: цитомегаловирусный промотор (для получения мышей с полным нокаутом TNF), CD4 (нокаут TNF в Т-клетках), CD19 (нокаут TNF в В-клетках), Mlys (нокаут TNF в макрофагах и нейтрофилах).

Как можно объяснить парадоксальное, на первый взгляд, явление: при одном и том же заболевании один и тот же регуляторный белок, являющийся продуктом единственного гена, может выступать одновременно в роли как патогенного, так и защитного фактора в зависимости от того, какие клетки его продуцируют? Для TNF такая возможность обусловлена сложной биологией этого цитокина и дифференциальным использованием двух рецепторов TNF, которые отличаются по механизмам передачи внутриклеточного сигнала, а также по тканеспецифичности экспрессии.

Кроме того, TNF существует в двух формах – растворимой и мембранно-связанной – так как предшественник этого регуляторного цитокина представляет собой классический трансмембранный белок. Считается, что TNF рецептор 2 (TNFR2, p75) предпочтительно узнает именно трансмембранную форму TNF, которая отвечает только за некоторые иммунорегуляторные свойства TNF [8]. Мы предполагаем, что защитный эффект TNF, продуцируемого Т-клетками при артрите, связан, по крайней мере, частично с контролем патогенных популяций Th1 и Th17 CD4+ Т-клеток в периферических лимфоидных органах, а не в суставах, где развиваются патологические процессы [7].

Недавние работы [9] указывают на то, что передача сигнала от TNFR2 имеет отношение к функции Т-регуляторных клеток, на поверхности которых этот рецептор высоко экспрессирован. Передача сигнала от TNFR2 внутрь Т-регуляторной клетки контролирует экспрессию ключевых генов: *FoxP3*, *CD25*, *CTLA4* и некоторых других, что определяет как стабильность дифференцировки, так и функциональность супрессорного статуса этих клеток.

Нами были сконструированы мыши, гуманизированные по TNF и TNFR2, и предусмотрена возможность специфически удалять TNFR2 в Т-регуляторных клетках (рис. 2).

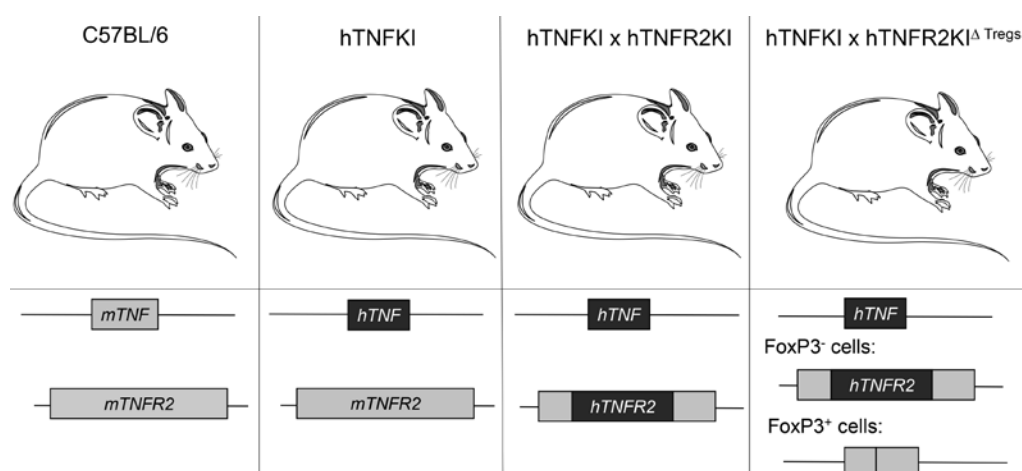


Рис. 2. Получение панели гуманизированных мышей по генам *bTNF* и *bTNFR2*, а также с тканеспецифическим нокаутом по *hTNFR2* в FoxP3+ клетках

Fig. 2. Schematic representation of a panel of mice, humanized for *bTNF* and *bTNFR2* genes, as well as mice with tissue-specific knock-out of *hTNFR2* in FoxP3+ cells

Оказалось, что у таких мышей аномально протекает ЭАЭ, что указывает на защитную роль передачи сигнала через TNFR2 именно в Т-регуляторных клетках (рис. 3) [10]. Мы также установили, что в ходе развития заболевания функциональность Т-регуляторных клеток из таких мышей снижена за счет нарушения передачи внутриклеточного сигнала от TNFR2. Поскольку в другой модели аутоиммунного заболевания защитная роль TNF (предположительно в мембранно-связанной форме) была приписана Т-лимфоцитам, а одной из «принимающих» клеточных популяций оказались Т-регуляторные клетки, в будущем мы планируем установить, какая субпопуляция Т-клеток и в каком органе или компартменте передает этот сигнал при ЭАЭ.

Отметим, что мыши, гуманизированные по TNF и его рецепторам, позволяют изучать эффекты лекарств, использующихся для антицитокиновой терапии в клинике. Из пяти широко применяемых

лекарств только одно – этанерцепт – блокирует TNF у мышей дикого типа. Важно отметить, что отличие этанерцепта от остальных блокаторов TNF состоит в его способности помимо TNF нейтрализовать растворимый LT альфа (LTα).

Напомним, что рекомбинантная форма LTα во всех экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* фактически эквивалентна TNF (включая способность вызывать геморрагический некроз опухолей у мышей). Однако до сих пор остается не до конца понятой физиологическая функция растворимой формы LT, LTα, которая передает сигналы через рецепторы TNF, а не через рецептор LT бета (LTβR). Долгое время считалось, что растворимой формы LTα в организме просто не существует, и LTα всегда связывается с LTβ, переходит в мембранно-связанную форму и сигнализирует через LTβR.

Однако в нашей недавней работе была установлена уникальная для LTα функция в биологии

лимфоидных клеток врожденного иммунитета, состоящая в контроле продукции иммуноглобулина А (IgA) в кишечнике [4]. Интересно, что именно этанерцепт, блокирующий не только TNF, но и LT, является единственным блокатором TNF, который не оказывает терапевтического эффекта при болезни Крона, тяжелом воспалительном заболевании кишечника. Открытие невырожденной функ-

ции LTα в поддержании гомеостаза в кишечнике за счет контроля продукции IgA проливает свет на данный клинический парадокс, позволяя предположить, что неэффективность этанерцепта может быть прямо или косвенно связана со способностью этого лекарства нейтрализовать не только TNF, но и LTα. Без сомнения, описанная проблема заслуживает отдельного детального изучения.

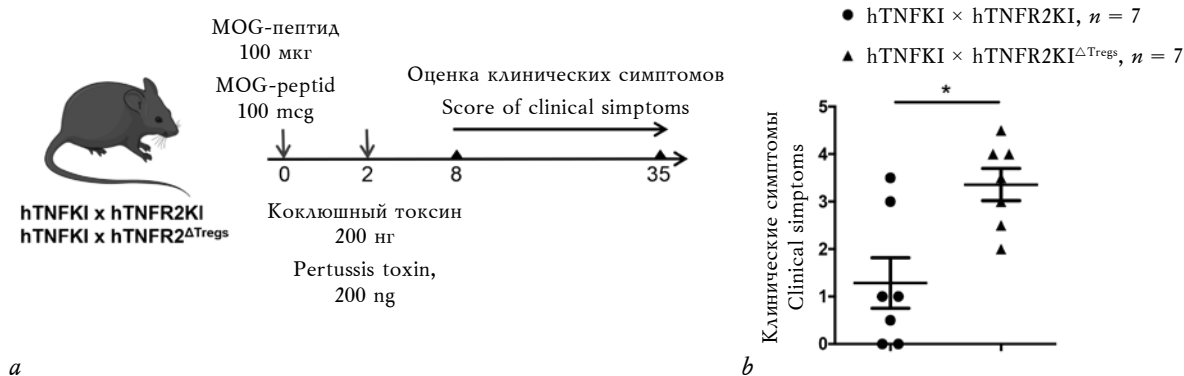


Рис. 3. Роль *TNF* и *TNFR2* в развитии энцефаломиелимита: *a* – индукция; *b* – развитие клинических симптомов у дважды гуманизированных мышей по генам *TNF* и *TNFR2* ($hTNFKI \times hTNFR2KI$) и с делецией *TNFR2* в Treg-клетках ($hTNFKI \times hTNFR2^{\Delta Tregs}$) [10]. * $p < 0,05$

Fig. 3. Role of *TNF* and *TNFR2* in development of EAE: *a* – induction; *b* – development of clinical symptoms in doubly humanized *TNF*/*TNFR2* mice ($hTNFKI \times hTNFR2KI$) and in mice with deletion of *TNFR2* in Treg-cells ($hTNFKI \times hTNFR2^{\Delta Tregs}$) [10]. * $p < 0.05$

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ БЛОКИРОВКА TNF, ПРОДУЦИРУЕМОГО МИЕЛОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ

Результаты генетических исследований в трех экспериментальных заболеваниях на мышах подсказали нам новую модальность антицитокиновой терапии, которая была впервые сформулирована 3 года назад [11]. В частности, нами были сконструированы и испытаны на гуманизированных мышах биспецифические антитела, узнающие цитокин человека (TNF), а также поверхностные маркеры на миелоидных клетках, что позволило избирательно блокировать биологическую актив-

ность TNF только из этого типа клеток. В качестве мишени биспецифических антител на поверхности миелоидных клеток мыши мы выбрали две поверхностные молекулы – F4/80 и CD11b [12] (рис. 4). Наша цель состояла в том, чтобы продвинуться в направлении создания лекарств, нейтрализующих патогенные функции TNF, но не затрагивающих главные защитные и гомеостатические свойства этого цитокина. Примером последних могут служить защитные функции TNF, продуцируемого Т-лимфоцитами в защите от микобактериальной инфекции [13], а также роль TNF, продуцируемого клетками гладкой мускулатуры в поддержании артериального давления [14].

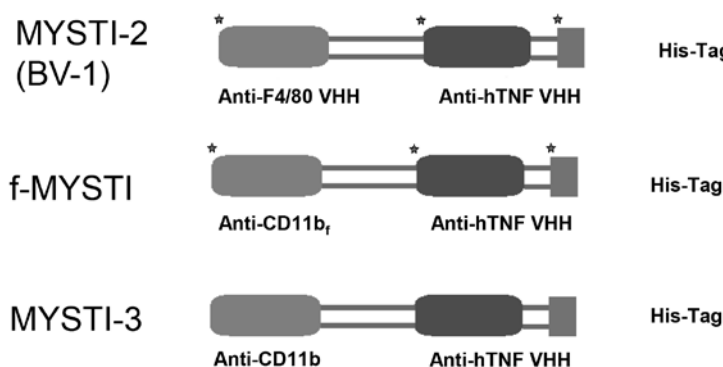


Рис. 4. Строение биспецифических антител, узнающих *bTNF* человека и поверхностные маркеры на миелоидных клетках мыши (F4/80 и CD11b), а также контрольной конструкции, которая узнает *TNF* человека, но не связывается с поверхностными молекулами макрофагов мыши [12]

Fig. 4. Structural scheme of bi-specific antibodies, recognizing *bTNF* and mouse myeloid cell surface molecules (F4/80 and CD11b), as well as the control construct, binding *bTNF*, but not any of the surface molecules of murine macrophages

Следующим шагом должна стать разработка прототипов лекарств, которые по тому же принципу могли бы взаимодействовать с маркерами миелоидных клеток человека [15]. К сожалению, наша фармацевтическая промышленность сконцентрирована на аналогах уже разработанных и одобренных зарубежных лекарств и пока не заинтересована в развитии проектов, которые неизбежно сопряжены с рисками.

СООТНЕСЕНИЕ ФУНКЦИЙ IL-6 С КОНКРЕТНЫМИ ВИДАМИ ЦИТОКИН-ПРОДУЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК

Мы предположили, что связь функции цитокина с конкретным типом клетки-продуцента существует не только у TNF, но и у других плеiotропных цитокинов, например IL-6 [16]. По-

этому по аналогии с исследованиями функций TNF, производимого отдельными видами клеток, нами была создана панель мышей с кондиционными нокаутами IL-6 (рис. 5). Для создания панели мутантов использовали мышей, полученных из лаборатории Dr. Juan Hildago, у которых второй экзон гена *IL-6* был фланкирован loxP-сайтами. Под действием рекомбиназы Cre этот участок гена удаляется, в результате нарушается экспрессия цитокина. Мышей с флосированным геном *IL-6* (*IL-6^{flox/flox}*) скрещивали с мышами, экспрессирующими рекомбиназу Cre под различными промоторами: промотор CMV (для получения мышей с полным нокаутом IL-6), CD11C (нокаут IL-6 в дендритных клетках), Mlys (нокаут IL-6 в макрофагах и нейтрофилах).

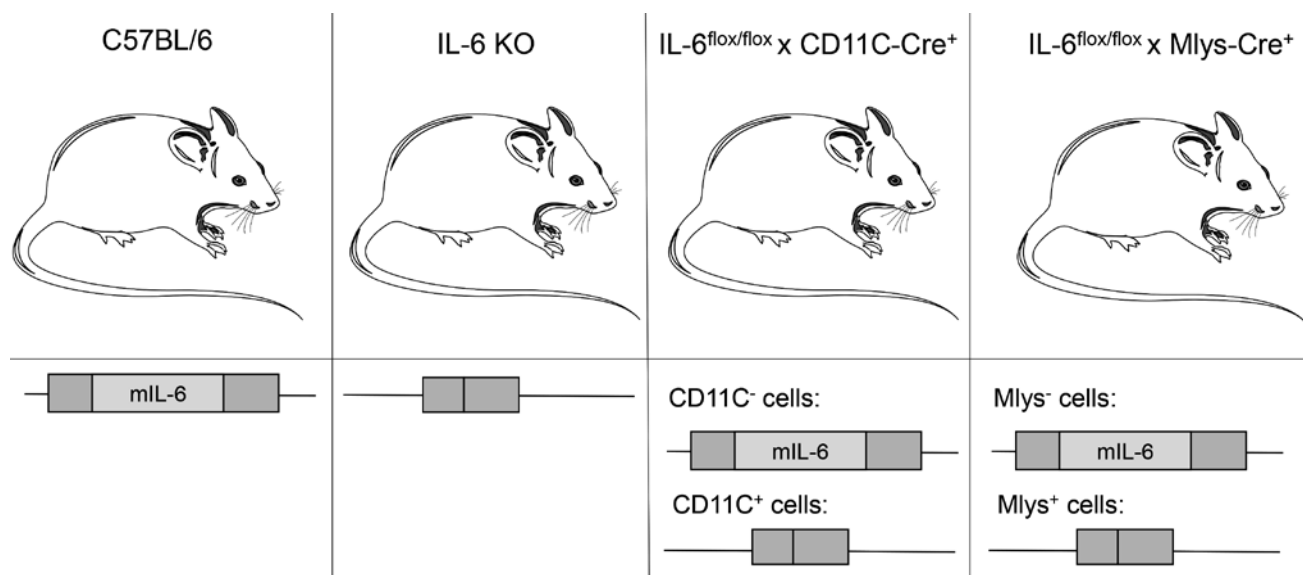


Рис. 5. Получение панели мышей с полным и тканеспецифическими нокаутами гена *IL-6* мыши
Fig. 5. Schematic representation of a panel of mice with complete and tissue-specific knock-out of *IL-6*

Информативность исследований на этой панели продемонстрирована в модели острой аллергической астмы, при которой удаление IL-6 в макрофагах или дендритных клетках по-разному модулировало развитие заболевания, вызывая разные подтипы аллергической астмы (рис. 6) [17].

Кроме того, нами были сконструированы трансгенные мыши с регулируемой сверхэкспрессией IL-6 человека (рис. 7).

Интересно, что сверхпродукция IL-6 человека, способного связываться и передавать сигнал через мышинный IL-6R только миелоидными клетками, приводила к анемии и неонатальной

летальности мышей [18], в механизмах которой еще предстоит разобраться. По аналогии с концепцией, которую мы развиваем для TNF, нами начаты работы по получению однодоменных антител к IL-6 человека, которые можно будет использовать в биспецифических антителах, избирательно блокирующих биологическую активность IL-6 из выбранных клеточных источников.

Однако эти работы осложняются недавно открытыми особенностями биологии IL-6 [19, 20], которые состоят в том, что этот цитокин может секретироваться в комплексе со своим растворимым рецептором.

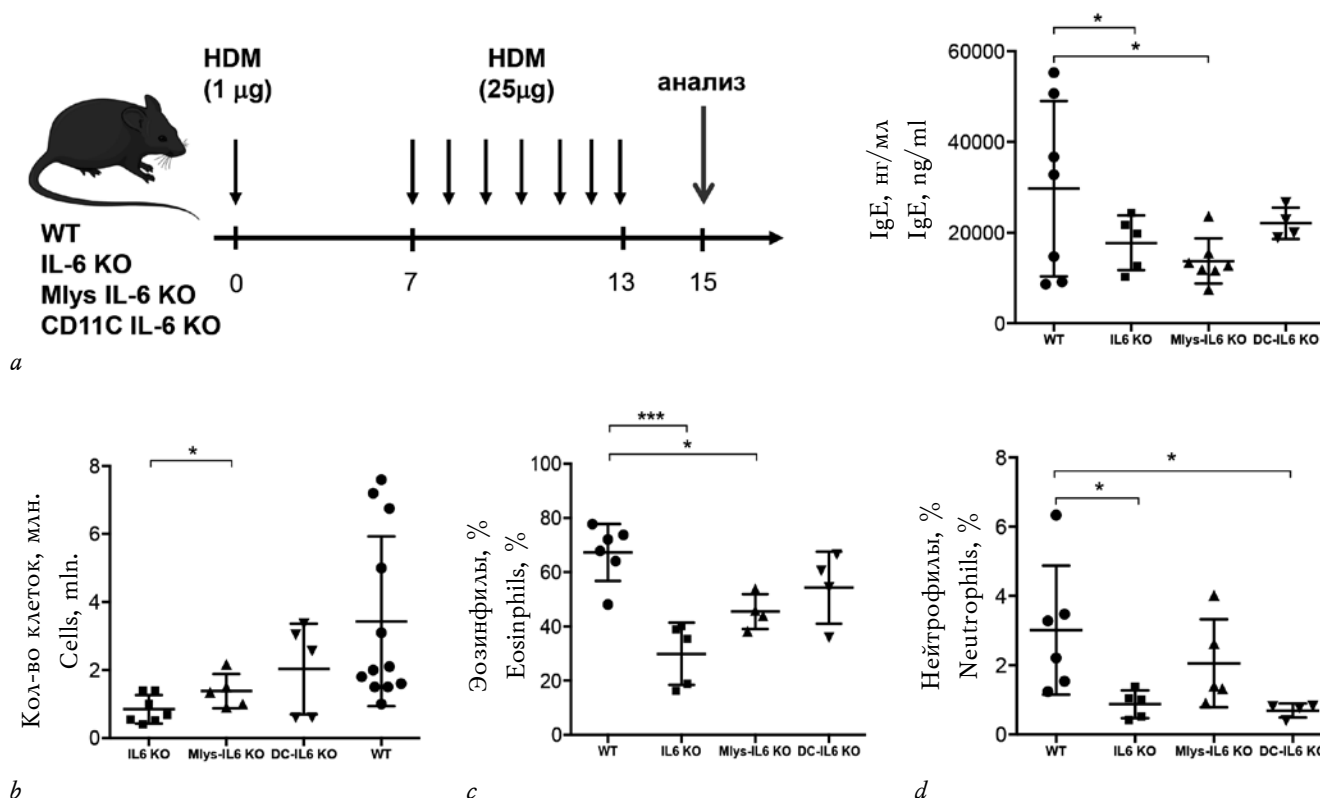


Рис. 6. Удаление *IL-6* в макрофагах или дендритных клетках по-разному модулирует развитие заболевания, вызывая разные подтипы аллергической астмы: *a* – эксперимент по индукции острой астмы у мышей посредством ежедневного интраназального введения 25 мкг экстракта пылевого клеща в течение 1 нед с сенсibilизирующим введением 1 мкг экстракта за 1 нед основного курса; *b* – концентрация IgE в сыворотке крови после индукции острой астмы у мышей, определенная методом иммуноферментного анализа, нг/мл; *c* – число клеток в бронхоальвеолярной жидкости у мышей при острой аллергической астме; *d* – доля эозинофилов и нейтрофилов от всех лейкоцитов бронхоальвеолярной жидкости после индукции острой астмы, определенная методом проточного цитофлуориметрического анализа, %. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Fig. 6. Deletion of *IL-6* in macrophages or dendritic cells modulates the development of asthma differently, resulting in two distinct allergic asthma subtypes: *a* – experiment with induction of acute asthma in mice by daily intranasal injection of 25 mcg house dust mite extract for 1 week, with sensitizing injection of 1 mcg extract 1 week before the course; *b* – IgE concentration in mouse blood serum after induction of acute asthma determined by ELISA, ng/ml; *c* – the number of cells in mouse epithelial lining fluid under acute allergic asthma; *d* – share of eosinophils and neutrophils from the total number of leukocytes in the epithelial lining fluid after induction of acute asthma, determined by flow cytometry, %. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многолетний цикл наших исследований продемонстрировал возможности технологий обратной генетики и биоинженерии антител в изучении фундаментальных проблем иммунологии. Известно, что практически для всех цитокинов были обнаружены невырожденные защитные и гомеостатические функции, выгодные для организма, и, вероятно, отобранные эволюцией. Наличие у цитокинов полезных регуляторных функций подразумевает, что системная антицитокиновая тера-

пия будет приводить к дефектам в работе иммунной системы, которые мы и наблюдаем у мышей с полными и некоторыми тканеспецифическими нокаутами. Таким образом, концепция системной терапии изначально подразумевает наличие опасных побочных эффектов. Мы предполагаем, что развитие специфической антицитокиновой терапии, преимущественно подавляющей патогенные свойства цитокина и не затрагивающей гомеостатические функции, является следующим шагом в разработке безопасных и эффективных лекарств.

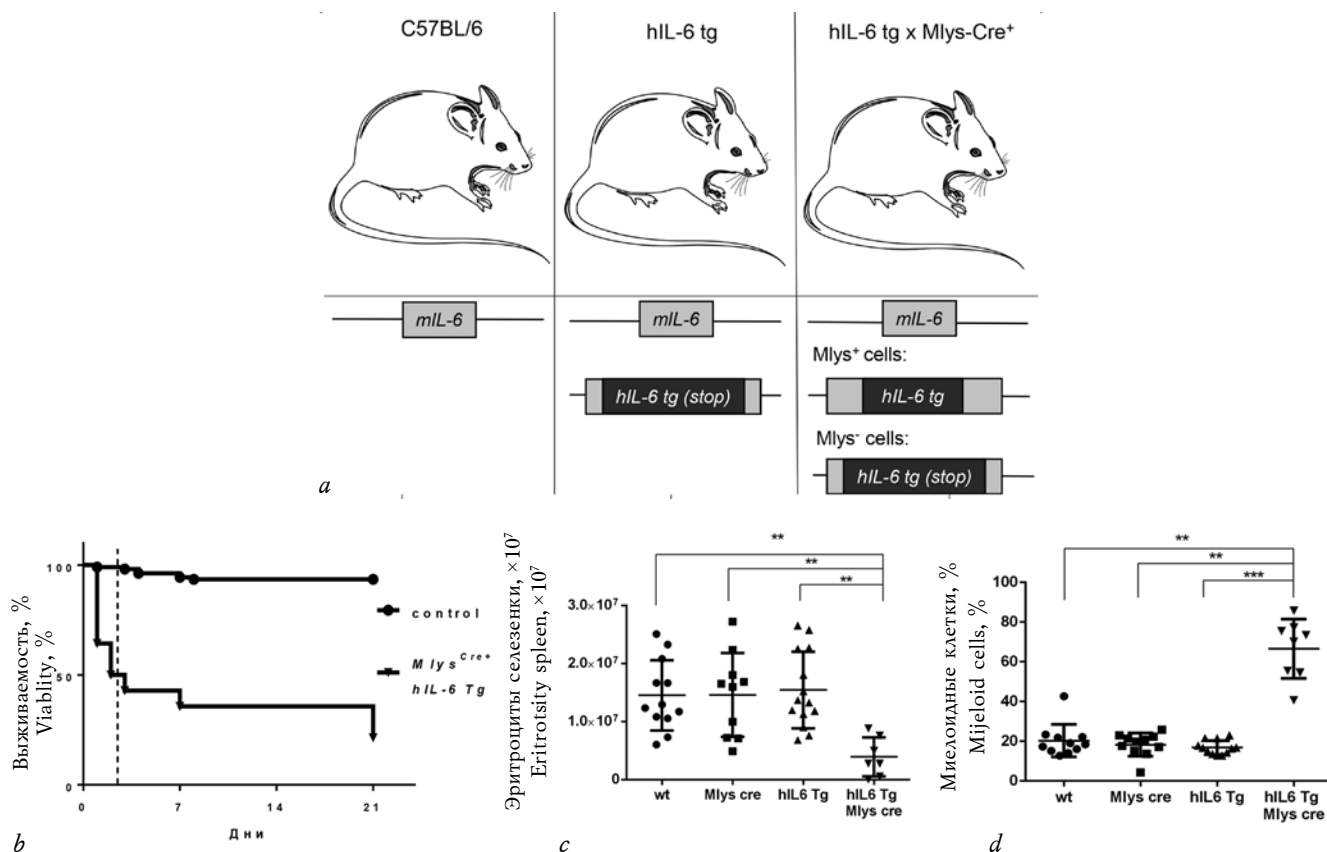


Рис. 7. Мыши со сверхэкспрессией IL-6 в миелоидных клетках погибают неонатально на фоне задержки роста, анемии и воспаления: *a* – скрещивание мышей MlysCre⁺ × hIL-6 Tg для получения мышей со сверхэкспрессией IL-6 человека в миелоидных клетках; *b* – кривая выживаемости, большая часть их потомства погибает в течение 1-й нед жизни; *c* – абсолютное число эритроцитов в селезенке трехдневных мышей MlysCre⁺ hIL-6 Tg значительно снижено по сравнению с однопометными мышами контрольных генотипов; *d* – доля миелоидных клеток CD45+CD11b+ в селезенке мышей MlysCre⁺ hIL-6 Tg снижена по сравнению с однопометными мышами контрольных генотипов. **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001

Fig. 7. Mice with overexpression of IL-6 in myeloid cells die neonatally due to growth arrest, anemia and systemic inflammation: *a* – crossing of MlysCre⁺ × hIL-6 Tg mice to obtain mice with overexpression of human IL-6 in myeloid cells; *b* – survival curve; most part of the offspring die during the first week after birth; *c* – the absolute number of erythrocytes in the spleen of 3 day-old MlysCre⁺ hIL-6 Tg mice is significantly lower than in the control littermates; *d* – share of myeloid CD45+CD11b+ cells in the spleen of MlysCre⁺ hIL-6 Tg mice is lower than in the control littermates. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001

Для двух важнейших провоспалительных цитокинов – TNF и IL-6 – возможность для разработки специфических блокаторов предусмотрена особенностями системы передачи сигнала. Кроме того, наше исследование подчеркивает информативность изучения экспериментальных модельных заболеваний на мышах (в том числе на гуманизированных мышах) как для установления молекулярных механизмов патологий, так и для доклинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Maini R.N., Elliott M., Brennan F.M., Williams R.O., Feldmann M. Targeting TNF alpha for the therapy of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1994; 12 (Suppl. 11): 63–66.
- Tumanov A., Kuprash D., Lagarkova M., Grivennikov S., Abe K., Shakhov A., Drutskaya L., Stewart C., Chervonsky A., Nedospasov S. Distinct role of surface lymphotoxin expressed by B cells in the organization of secondary lymphoid tissues. *Immunity.* 2002; 17 (3): 239–250. DOI: 10.1016/S1074-7613(02)00397-7.
- Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Kruglov A.A., Marakusha B.I., Shakhov A.N., Murakami T., Drutskaya L.N., Forster I., Clausen B.E. et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity.* 2005; 22 (1): 93–104. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.11.016.
- Kruglov A.A., Grivennikov S.I., Kuprash D.V., Winsauer C., Prepens S., Selezniek G.M., Eberl G., Littman D.R., Heikenwalder M., Tumanov A.V. et al. Nonredundant func-

- tion of soluble LTalpha3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science*. 2013; 342 (6163): 1243–1246. DOI: 10.1126/science.1243364.
5. Alimzhanov M.B., Kuprash D.V., Kosco-Vilbois M.H., Luz A., Turetskaya R.L., Tarakhovsky A., Rajewsky K., Nedospasov S.A., Pfeffer K. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94 (17): 9302–9307.
 6. Kruglov A.A., Lampropoulou V., Fillatreau S., Nedospasov S.A. Pathogenic and protective functions of TNF in neuroinflammation are defined by its expression in T lymphocytes and myeloid cells. *Journal of Immunology*. 2011; 187 (11): 5660–5670. DOI: 10.4049/jimmunol.1100663.
 7. Drutskaya M.S., Efimov G.A., Astrakhantseva I.V., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. Making anti-cytokine therapy more selective: Studies in mice. *Cytokine*. 2018; 101: 33–38. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.08.022.
 8. Grell M., Douni E., Wajant H., Lohden M., Clauss M., Maxeiner B., Georgopoulos S., Lesslauer W., Kollias G., Pfizenmaier K. et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995; 83 (5): 793–802.
 9. Chen X., Wu X., Zhou Q., Howard O.M., Netea M.G., Oppenheim J.J. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell phenotype in the inflammatory environment. *Journal of Immunology*. 2013; 190 (3): 1076–1084. DOI: 10.4049/jimmunol.1202659.
 10. Atretkhany K.-S.N., Mufazalov I.A., Dunst J., Kuchmiy A., Gogoleva V.S., Andruszewski D., Drutskaya M.S., Faustman D.L., Schwabenland M., Prinz M. et al. Intrinsic TNFR2 signaling in T regulatory cells provides protection in CNS autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018; 115 (51): 13051–13056. DOI: 10.1073/pnas.1807499115.
 11. Efimov G.A., Kruglov A.A., Khlopchatnikova Z.V., Rozov F.N., Mokhonov V.V., Rose-John S., Scheller J., Gordon S., Stacey M., Drutskaya M.S. et al. Cell-type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113 (11): 3006–3011. DOI: 10.1073/pnas.1520175113.
 12. Nosenko M.A., Atretkhany K.N., Mokhonov V.V., Efimov G.A., Kruglov A.A., Tillib S.V., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. VHH-Based Bispecific Antibodies Targeting Cytokine Production. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 1073. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01073.
 13. Allie N., Grivennikov S.I., Keeton R., Hsu N.J., Bourigault M.L., Court N., Fremont C., Yermeev V., Shebzukhov Y., Ryffel B. et al. Prominent role for T cell-derived tumour necrosis factor for sustained control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Sci. Rep.* 2013; 3: 1809. DOI: 10.1038/srep01809.
 14. Kroetsch J.T., Levy A.S., Zhang H., Aschar-Sobbi R., Lidington D., Offermanns S., Nedospasov S.A., Backx P.H., Heximer S.P., Bolz S.S. Constitutive smooth muscle tumour necrosis factor regulates microvascular myogenic responsiveness and systemic blood pressure. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14805. DOI: 10.1038/ncomms14805.
 15. Drutskaya M.S., Efimov G.A., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. Can we design a better anti-cytokine therapy? *J. Leukoc. Biol.* 2017; 102 (3): 783–790. DOI: 10.1189/jlb.3MA0117-025R.
 16. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014; 6 (10): a016295. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295.
 17. Gubernatorova G.O., Gorshkova E.A., Namakanova O.A., Zvartsev R.V., Hidalgo J., Drutskaya M.S., Tumanov A.V., Nedospasov S.A. Non-redundant functions of IL-6 produced by macrophages and dendritic cells in allergic airway inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 2718. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02718.
 18. Зварцев Р.В., Коршунова Д.С., Горшкова Е.А., Носенко М.А., Корнеев К.В., Максименко О.Г., Коробко И.В., Купраш Д.В., Друцкая М.С., Недоспасов С.А., Дейкин А.В. Неонатальная смертность и воспалительный фенотип у новых трансгенных мышей со сверхэкспрессией интерлейкина-6 человека в миелоидных клетках. *Доклады Академии наук*. 2018; 483 (4): 344–347. [Zvartsev R.V., Korshunova D.S., Gorshkova E.A., Nosenko M.A., Korneev K.V., Maximenko O.G., Korobko I.V., Kuprash D.V., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Deikin A.V. Neonatal lethality and inflammatory phenotype of new transgenic mice with overexpression of human interleukin-6 in myeloid cells. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2018; 483 (1): 344–347 (in Russ.)]. DOI: 10.1134/S1607672918060157.
 19. Heink S., Yogev N., Garbers C., Herwerth M., Aly L., Gasperi C., Husterer V., Croxford A.L., Moller-Hackbarth K., Bartsch H.S. et al. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunology*. 2017; 18 (1): 74–85. DOI: 10.1038/ni.3632.
 20. Rose-John S., Winthrop K., Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nature Reviews. Rheumatology*. 2017; 13 (7): 399–409. DOI: 10.1038/nrrheum.2017.83.

Вклад авторов

Друцкая М.С., Губернаторова Е.О., Горшкова Е.А., Атретханы К.-С.Н., Носенко М.А., Гоголева В.С., Намаканова О.А., Зварцев Р.В., Круглов А.А. – проведение исследова-

Authors contribution

Drutskaya M.S., Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Atretkhany K.-S.N., Nosenko M.A., Gogoleva V.S., Namakanova O.A., Zvartsev R.V., and Kruglov A.A. performed

дований, анализ и интерпретация данных. Друцкая М.С., Губернаторова Е.О., Горшкова Е.А., Атреткханы К.-С.Н., Носенко М.А., Круглов А.А., Недоспасов С.А. – разработка концепции и дизайна исследования, обоснование цели, основных положений и заключения рукописи. Друцкая М.С., Губернаторова Е.О. – проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение рукописи для публикации.

experiments, analyzed data and interpreted the results. Drutskaya M.S., Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Atretkhany K.-S.N., Nosenko M.A., Kruglov A.A., and Nedospasov S.A. worked on the concept and designed the experiments, provided experimental tools and background, summarized the experimental data for the manuscript. Drutskaya M.S., Gubernatorova E.O., and Nedospasov S.A. critically read and finalized the manuscript.

Сведения об авторах

Друцкая Марина Сергеевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, ИМБ РАН; вед. науч. сотрудник, кафедра иммунологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Губернаторова Екатерина Олеговна, мл. науч. сотрудник, ИМБ РАН; аспирант, кафедра иммунологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Горшкова Екатерина Александровна, лаборант-исследователь, ИМБ РАН; аспирант, кафедра иммунологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Атреткханы Камар-Сулу Нияз кызы, мл. науч. сотрудник, ИМБ РАН; аспирант, кафедра иммунологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Носенко Максим Андреевич, мл. науч. сотрудник, ИМБ РАН; аспирант, кафедра иммунологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Гоголева Виолетта Сергеевна, лаборант-исследователь, ИМБ РАН; студент, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Намаканова Ольга Александровна, лаборант-исследователь, ИМБ РАН; студент, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Зварцев Руслан Валерьевич, мл. науч. сотрудник, ИМБ РАН, г. Москва.

Круглов Андрей Алексеевич, канд. биол. наук, ст. инженер-исследователь, ИМБ РАН; ст. науч. сотрудник, НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Недоспасов Сергей Артурович, д-р биол. наук, академик РАН, гл. науч. сотрудник, зав. лабораторией молекулярных механизмов иммунитета, ИМБ РАН; зав. кафедрой иммунологии, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

(✉) Друцкая Марина Сергеевна, e-mail: marinadru@gmail.com.

Authors information

Drutskaya Marina S., PhD, Senior Researcher, EIMB RAS; Senior Researcher, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Gubernatorova Ekaterina O., Junior Researcher, EIMB RAS; PhD-student, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Gorshkova Ekaterina A., Research Associate, EIMB RAS; PhD-student, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Atretkhany Kamar-Sulu N., Junior Researcher, EIMB RAS; PhD-student, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Nosenko Maxim A., Junior Researcher, EIMB RAS; PhD-student, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Gogoleva Violetta S., Research Associate, EIMB RAS; Junior Researcher, EIMB RAS; PhD-student, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Namakanova Olga A., Research Associate, EIMB RAS; Junior Researcher, EIMB RAS; PhD-student, Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Zvartsev Ruslan V., Junior Researcher, EIMB RAS, Moscow, the Russian Federation.

Kruglov Andrey A., PhD, Senior Researcher Engineer, EIMB RAS; Senior Researcher, A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

Nedospasov Sergei A., DBSc, RAS, Leading Researcher, Head of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, EIMB RAS; Head of the Department of Immunology, LMSU, Moscow, the Russian Federation.

(✉) Drutskaya Marina S., e-mail: marinadru@gmail.com.

Поступила в редакцию 08.11.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Received 08.11.2018
Accepted 17.12.2018

Микробициды для топической иммунопрофилактики ВИЧ-инфекции

Жернов Ю.В., Хаитов М.Р.

*Институт иммунологии
Россия, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24*

РЕЗЮМЕ

Микробициды являются антисептическими топическими лекарственными средствами, способствующими напрямую или опосредованно сдерживать проникновение инфекционного агента в организм человека, тем самым предотвращая половую передачу вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и других заболеваний, передающихся половым путем. Они обладают не только прямым местным противовирусным механизмом действия при половой передаче ВИЧ, но и влияют на компоненты мукозального иммунитета во влагалище.

В данной статье авторами рассмотрены фармацевтические и биомедицинские аспекты применения кандидатных микробицидов, представлены разнообразные классификации этих препаратов, описаны наиболее значимые представители каждой химической группы, указаны механизмы их действия. Помимо этого даны представления о структуре и функции мукозального иммунитета и показана значимость мукозального иммунного ответа на вирус при половой передаче ВИЧ-инфекции. Отдельно рассматриваются экспериментальные модели, которые применяются для тестирования кандидатных микробицидов. Для каждого описанного в статье химического соединения представлен краткий обзор доклинических и клинических исследований по разработке на его основе микробицида. Даны общие представления о таком новом разнообразном классе медицинских иммунобиологических препаратов, как микробициды, которые должны в ближайшем будущем уменьшить риск половой передачи ВИЧ и сдержать эпидемию ВИЧ-инфекции и синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД).

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, СПИД, микробициды, топическая профилактика, мукозальный иммунитет.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Жернов Ю.В., Хаитов М.Р. Микробициды для топической иммунопрофилактики ВИЧ-инфекции. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 49–59. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-49-59>.

УДК 616.98:578.28HIV-085.37

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-49-59>

Microbicides for topical immunoprevention of HIV infection

Zhernov Yu.V., Khaitov M.R.*Institute of Immunology**24, Kashirskoye Sh., Moscow, 115478, Russian Federation*

ABSTRACT

Microbicides are antiseptic topical drugs that help directly or indirectly inhibit the penetration of an infectious agent into the human body, thereby preventing the sexual transmission of HIV-infection and other sexually transmitted diseases. Microbicides have an antiviral mechanism of action in the sexual transmission of HIV and affect the components of mucosal immunity in the vagina. In this article, the pharmaceutical and biomedical aspects of microbicide application are examined and diverse classifications of microbicides are presented. For each group of chemicals, the most important representatives and their mechanisms of action are described.

This article also presents the structure and function of mucosal immunity, and shows the importance of the mucosal immune response in the sexual transmission of HIV. This work also exhibits the experimental models for testing of candidate microbicides. For each compound described, a review of preclinical research and clinical trials is provided, covering its development as a microbicide. This paper gives an overview of microbicides, a new class of chemically diverse immunobiological medications reducing the risk of sexual transmission of HIV. The use of microbicides is believed to curb the HIV/AIDS epidemic in the nearest future.

Key words: HIV infection, AIDS, microbicides, topical prevention, mucosal immunity.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that they have received no funding for the study.

For citation: Zhernov Yu.V., Khaitov M.R. Microbicides for topical immunoprevention of HIV infection. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 49–59. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-49-59>.

ВВЕДЕНИЕ

По данным ЮНЭЙДС, в 2017 г. число живущих с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) в мире составило 36,9 млн, из которых около 10% являются детьми моложе 15 лет. В 2017 г. число новых случаев заражения ВИЧ составило более 1,8 млн человек. От оппортунистических инфекций при синдроме приобретенного иммунодефицита (СПИД) в 2017 г. умерли более 940 тыс. человек. При этом к концу 2017 г. уже более 35 млн больных СПИДом умерли во всем мире с момента фиксирования первых случаев заражения в 1981 г.

В 2017 г. в России зарегистрировано более 1,1 млн ВИЧ-инфицированных, в том числе 8 527 детей, из которых 6 532 рождены ВИЧ-инфицированными матерями [1]. Однако оценочно

в России проживает не менее 1,5 млн ВИЧ-инфицированных граждан и 100 тыс. временно прибывших ВИЧ-инфицированных иностранцев. Борьба с ВИЧ-инфекцией и мониторинг ВИЧ-инфекции и СПИДа остаются важнейшими задачами российского здравоохранения [2].

Проблема ВИЧ-инфекции еще далека от своего разрешения. Однако первичная серодиагностика ВИЧ-инфекции в комбинации с высокоактивной специфической антиретровирусной терапией позволила приостановить распространение эпидемии и продлить жизнь инфицированных пациентов [3]. Стало понятным, что до момента появления эффективной вакцины необходим комплексный подход в борьбе с ВИЧ-инфекцией и СПИДом с применением всех средств терапии и профилактики. Более того, проведенные исследования достоверно показывают, что

профилактика ВИЧ-инфекции в группах высокого риска является экономически более выгодной, чем терапия [4].

В макрорегионах мира эпидемия ВИЧ-инфекции и СПИДа является неоднородной. В развитых странах за последние 5 лет эпидемию удалось повернуть вспять за счет проведения единых государственных программ лечения, а также активной разработки учеными лекарственных препаратов и вакцин против ВИЧ-инфекции. В развивающихся странах наблюдается противоположная ситуация, происходит экспоненциальный рост числа новых случаев заражения ВИЧ, причем более 50% случаев регистрируются среди женщин [5]. Феминизация ВИЧ-инфекции характерна для поздних стадий эпидемий при заражении все большего числа людей. Наихудшая ситуация наблюдается в странах Южной Африки, где менее чем 7% женщин вступают в половые контакты с новым партнером с презервативом, при этом в Южной Африке проживает около 20% от числа всех инфицированных ВИЧ [6]. В связи с этим остро стоит вопрос разработки дополнительных средств профилактики, контролируемых женщиной, вне зависимости от полового партнера. Такими средствами профилактики стали микробициды.

ОБЩИЕ ПОНЯТИЯ О МИКРОБИЦИДАХ

Под микробицидами следует понимать антисептические топические лекарственные средства, способствующие напрямую или опосредованно сдерживать проникновение инфекционного агента в организм человека, тем самым предотвращая заражение. Микробициды наряду с вакцинами и доконтактной профилактикой относятся к средствам биомедицинской профилактики ВИЧ-инфекции и СПИДа. В данной статье рассматриваются микробициды, защищающие от вируса иммунодефицита человека, хотя по определению возможна разработка микробицидов против всех известных заболеваний, передающихся половым путем.

В настоящее время в России, как и во всем мире, микробицидов на фармацевтическом рынке нет. Хотя на разных стадиях фармакологических испытаний находятся десятки препаратов, и более сотни потенциальных веществ тестируются на анти-ВИЧ-активность. Разработка и поиск эффективных микробицидов являются актуальной задачей биомедицинской профилактики ВИЧ-инфекции и СПИДа [7]. Использование работниками коммерческого секса микробицидов с эффективностью 50–80% позволит снизить

ежедневный риск заражения на 28%, а микробицидов с эффективностью 30–50% (подавляющее большинство современных тестируемых микробицидов) – на 17%. Микробицид с эффективностью 60%, используемый в 73 развивающихся странах, при учете, что только 20% женщин этих стран сексуально активны, сможет предотвратить заражение 2,5 млн людей ВИЧ-инфекцией за 3 года. Наиболее масштабные клинические испытания микробицидных препаратов на сегодняшний день проведены CAPRISA (1,0%-й вагинальный гель тенофовир) и VOICE (1,0%-й вагинальный гель тенофовир в комбинации с двумя оральными препаратами Viread и Truvada на основе тенофовира). Есть данные о том, что степень защиты от заражения ВИЧ среди исследуемых групп мужчин, практикующих секс с мужчинами, при использовании микробицидов составила более 90%, причем защита от заражения может быть близка к 100% при регулярном и достаточном применении Truvada [8].

Перед разработчиками микробицидов поставлены глобальные задачи: микробициды должны осуществлять первичную защиту от ВИЧ (в отсутствие презервативов), вторичную защиту от ВИЧ (при разрыве презерватива) и, что немаловажно, микробициды являются препаратами сдерживания эпидемии до момента разработки анти-ВИЧ-вакцин. Микробициды должны отвечать следующим требованиям: быть безопасными для человека и не разрушать эпителиальные барьеры в местах их нанесения, обладать высокой эффективностью и продолжительностью действия, кумулятивным эффектом, защищать от нескольких инфекционных агентов, оказывать спермицидный и ранозаживляющий эффекты, иметь низкую себестоимость и отпускаться в аптеках без рецепта.

МУКОЗАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Так как микробициды созданы для профилактики половой передачи ВИЧ-инфекции, они способны влиять на мукозальный иммунный ответ во влагалище. Мукозальная иммунная система является сдерживающим фактором для инфекционных агентов при половом пути передачи, являясь автономной подсистемой иммунитета. Главной составляющей мукозальной иммунной системы наряду с эпителием барьерных органов является мукозо-ассоциированная лимфоидная ткань.

Дистальные отделы женских половых путей выстилает многослойный плоский неороговевающий эпителий, экспрессирующий толл-подобные

рецепторы и выделяющий слизь, включающий клетки Лангерганса и CD8a+ $\gamma\delta$ Т-клетки. В подслизистом слое находятся макрофаги, NK-клетки, интерстициальные дендритные клетки, CD4+ и CD8+ Т-клетки, В-клетки [9–11]. Миграция клеток осуществляется в региональные лимфатические узлы, где происходит иммунный ответ.

Особенностями мукозальной иммунной системы дистальных отделов урогенитального тракта являются: преобладание иммуноглобулина (Ig) G по сравнению с секреторным IgA (sIgA), отсутствие организованных лимфатических фолликулов в субмукозе, влияние половых гормонов на регуляцию иммунных процессов. Слизистый секрет содержит флору Дедерлейна: лактобациллы, бифидобактерии, пептострептококки, представляющие 80–95% всей микрофлоры, составляющие нормоценоз влагалища. Доля лактобацилл (палочек Дедерлейна) составляет не менее 80% от общего количества микроорганизмов (10^8 – 10^{12} КОЕ/мл). Во влагалище присутствуют H_2O_2 , лизоцим, антимикробные пептиды и другие факторы антимикробной резистентности.

Однозначного механизма персистенции ВИЧ через эпителиальный барьер не описано. Известно, что не все вирионы могут проникнуть через слизистые оболочки [12–14]. То есть уже на первых этапах инфекционного процесса происходит селекция генотипа вируса, что отсутствует при парентеральном пути передачи, который, по-видимому, и определяет такое разнообразие циркулирующих рекомбинантных форм ВИЧ.

Мукозальный иммунный ответ на инфекцию ВИЧ-1 включает несколько этапов [15]. Инфекционные вирионы, как ассоциированные с клетками, так в виде свободных частиц, заражают хозяина по одному из вышеописанных путей. Вирусные частицы, не ассоциированные с клетками, могут быть связаны и нейтрализованы sIgA, молекулы которого секретируются В-клетками на поверхность слизистой [16, 17]. Активацию В-клеток поддерживают мукозные дендритные клетки, которые помогают в их переключении с выработки IgG на sIgA [18]. Не связавшиеся с sIgA вирусные частицы захватываются дендритными клетками и попадают в субмукозный эпителий, где заражают Т-клетки CD4+ и макрофаги. Однако ВИЧ, захваченный дендритными клетками, может быть блокирован по Fc-опосредованному механизму. ВИЧ-специфические нейтрализующие антитела могут ингибировать передачу вируса от дендритных клеток к Т-клеткам [19]. Существует, вероятно, еще множество неописанных механизмов ингибирования вируса в субму-

козе, которые являются второй селективной системой для генетического разнообразия ВИЧ при половом механизме передачи.

После передачи ВИЧ CD4 Т-клеткам микроциркуляторного русла наступает системный иммунный ответ, при котором вирус-специфические антитела связывают вирионы и нейтрализуют их или связываются с Fc-рецепторами, опосредуя активацию антивирусного ответа другими клетками. Т-клетки CD8+ продуцируют цитокины и лизируют зараженные Т-клетки CD4+, а Т-клетки CD4+ продуцируют цитокины и костимулируют эффекторные клетки, такие как цитотоксичные Т-лимфоциты [15]. Время наступления системного иммунного ответа от момента инфицирования варьирует в пределах 48–72 ч.

Учитывая описанное, при разработке микробицидов крайне важно понимать, что для обеспечения первой линии защиты от проникновения ВИЧ через слизистую необходимо не только, чтобы данные препараты обладали противовирусной активностью, но и не нарушали нормофлору влагалища, не разрушали эпителий и не приводили к большей возможности проникновения вируса. При этом конкурентным преимуществом при создании микробицидов является наличие у них способности к стимулированию мукозального иммунного ответа – второй линии защиты от проникновения ВИЧ, например способности вызвать эффективные В-клеточные ответы с продолжительно циркулирующими защитными NAb на слизистых оболочках.

КЛАССИФИКАЦИЯ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ МИКРОБИЦИДОВ

Все современные кандидатные микробициды можно разделить на препараты быстрого действия, которые должны быть использованы в течение 1 ч до или после полового акта, и препараты, способные высвободить активный компонент длительное время (продолжительного действия). К первому типу можно отнести такие формы выпуска микробицидов, как гели, кремы, мази, лосьоны, аэрозоли, таблетки, жидкости для полоскания и аппликационные пленки. Преимуществом этих форм микробицидов является простота их нанесения или введения, недостатком – непродолжительный период действия активного компонента в связи с быстрым удалением с поверхности эпителия.

Ко второму типу препаратов относят микробициды, форма выпуска которых сочетается со специальными приспособлениями – контрацептивными губками, вагинальными кольцами,

маточными (цервикальными) колпачками, либо заключена в вагинальные или ректальные свечи. Преимуществом таких форм выпуска микробицидов будет являться более длительный период поддержания вирулицидной концентрации активного вещества (свечи – около 12 ч; губки, колпачки и кольца требуют замены только один раз в месяц). Недостатком форм микробицидов с длительным механизмом действия является их механическая установка, которая может потребовать гинекологического вмешательства.

Выделяют следующие структурно-функциональные группы микробицидов: детергенты, или поверхностно-активные вещества (ПАВ); стабилизаторы pH и усилители кислотности; полианионы; дендримеры; полисахарид-связывающие пептиды; ингибиторы репликации ВИЧ. Механизм действия микробицидов на основе детергентов, или ПАВ, сводится к солюбилизации оболочки вируса и разрушению капсидных белков. Известными представителями данного класса микробицидов являются ноноксинол-9 (N-9), додецилсульфат натрия (натриевая соль лаурилсерной кислоты, sodium dodecyl sulfate (SDS)), и смесь цетил-N-бетаина и оксида мирамистина (1,0% C31G; SAVVY) [20].

Данный механизм действия детергентов является неспецифическим, эпителий человека также подвергается разрушению, образуются эрозии и язвы, что приводит к увеличению риска заражения ВИЧ. Фаза II клинических испытаний ноноксинола-9 показала увеличение риска инфицирования ВИЧ при использовании препарата более 3 раз в сутки [21]. Фаза III клинических испытаний вагинального геля SAVVY на основе 1,0%-го раствора смеси цетил-N-бетаина и оксида мирамистина, проводимые в Гане и Нигерии, не показали значительных отличий данного препарата от плацебо, что свидетельствует о низкой анти-ВИЧ-активности [22]. Аналогичные результаты были получены и при тестировании геля на основе додецилсульфата натрия, хотя данный продукт позиционировался как потенциальный ингибитор оболочечных (ВИЧ, вирус простого герпеса) и безоболочечных вирусов (вирус папилломы человека, ротавирус, полиовирус) [23]. По этой причине разработка микробицидов на основе детергентов на данный момент прекращена.

Другой группой микробицидов с неспецифическим механизмом действия являются стабилизаторы pH и усилители кислотности. Такие микробициды относятся только к вагинальным, а механизм их действия сводится к поддержанию кислой среды влагалища женщины на уровне

pH 4. Все микробициды этой группы являются и спермицидами, так как pH семенной жидкости нейтрализует кислую среду влагалища, способствующей проникновению вируса. Интересно то, что в некоторых районах Африки в племенах женщины использовали лимонный сок, предохраняясь от нежелательной беременности. Лимонная и яблочная кислоты, входящие в состав лимонного сока, обладают вирулицидной активностью, т. е. являются микробицидами. Но, как и ПАВ, данные кислоты обладают эрозивным действием на эпителий влагалища. В начале XXI в. врачами была предпринята попытка использовать лактобактерии как микробициды-стабилизаторы pH влагалища. Лактобактерии достаточно давно используются для лечения различных дисбиозов, но эффект такой терапии остается недолгим, а рост колоний лактобактерий занимает достаточно долгое время. Впоследствии исследования по разработке микробицидов на основе генетически не модифицированных *Lactobacillus sp.* прекратились.

Современным представителем микробицидов – усилителей собственной защиты эпителия является Buffer Gel. Его активный компонент – карбопол, представляющий собой полимер акриловой кислоты, способной значительно снижать кислотность среды влагалища. Доклинические испытания Buffer Gel, проведенные на макаках с использованием методов вагинальной кольпоскопии и ректального лаважа, показали его эффективность в отношении передачи вируса иммунодефицита обезьян (ВИО, англ. simian immunodeficiency virus (SIV)), и нежелательной беременности без нарушения целостности эпителия влагалища [24]. Клинические исследования, проведенные на женщинах-добровольцах в Индии и Таиланде, подтвердили эффективность действия препарата [25]. В 2009 г. Национальный институт алергологии и инфекционных болезней США (NIAID) выявил угнетение врожденного иммунитета при многократном использовании Buffer Gel, что приостановило выход данного продукта на фармацевтический рынок.

Группа микробицидов на основе полианионов и дендримеров включает в себя такие вещества, как каррагинаны, полимеры нафталинсульфоната, сульфат целлюлозы, наноразмерные дендримеры и гуминовые кислоты. Общим механизмом действия этой группы микробицидов является ингибирование фузии вируса путем связывания поверхностных белков ВИЧ или рецепторов и корецепторов клеток-мишеней.

Одними из первых микробицидов этой группы были каррагинаны – семейство линейных сульфат-

тированных полисахаридов. Каррагинаны сходны по своей структуре с гепарансульфатом, который используется многими микроорганизмами в качестве биохимического рецептора для первоначального прикрепления к клеточной мембране. Таким образом, каррагинаны выступают в качестве рецепторов-ловушек для фузии вируса [26]. Однако фаза III клинических испытаний, проведенная на 4 000 женщинах-добровольцах в Южной Африке в 2004–2007 гг., показала отсутствие статистически значимого влияния каррагинанов на половую передачу ВИЧ-инфекции [27].

Другими полианионными микробицидами являются полимеры нафталинсульфоната PIC 024-4 и PRO 2000. Механизм действия PRO 2000 сводится к конкуренции за связывание петли V3 белка ВИЧ gp120 с рецептором клеток-мишеней CD4 [28]. Масштабные клинические испытания вагинального геля PRO 2000, проведенные Microbicides Development Programme (MDP 301) на более чем 9 300 женщинах-добровольцах из ЮАР, Танзании, Уганды и Замбии, показали безопасность препарата, но его эффективность не была доказана.

Большой интерес в создании микробицидов вызывают дендримеры (арборолы) – макромолекулы с древообразной и регулярно ветвящейся структурой. На основе синтезированных дендримеров австралийской фармацевтической компанией Starpharma был разработан лубрикант Viva Gel. Доклинические испытания указывают на его высокую эффективность 85–100% при блокировании передачи вируса иммунодефицита обезьян (ВИО) у макаков. На данный момент Viva Gel проходит III фазу клинических испытаний.

Достаточно перспективными, по мнению авторов, природными дендримероподобными микробицидами могут стать гуминовые кислоты [29, 30]. Гуминовые кислоты являются сверхразветвленными полиэлектролитами, которые широко распространены в окружающей среде и представляют органические компоненты почвы, торфа, угля, пелоидов и водных систем. Структура гуминовых кислот представлена сетью полидисперсных ароматических и алифатических структур, высоко замещенных карбоксильными и гидроксильными группами. Гуминовые кислоты являются малотоксичными веществами [31] с антиоксидантной активностью [32]. В связи с наличием нескольких активных центров гуминовые кислоты можно рассматривать как комплексные микробициды. Показано, что синтетические аналоги гуминовых кислот, полученные путем полимеризации гидрохинона (HS-1500, оксигумат), способны ингибировать ВИЧ в клетках MT-2 [33], при этом полуэф-

фективная концентрация составила 50–300 нг/мл, а полутоксическая концентрация – 600 мкг/мл. Предположительным механизмом действия HS-1500 является блокирование связывания петли V3 gp120 с CD4 рецептором клеток-мишеней. Исследование Г.К. Жоопе и соавт. показало, что HS-1500 усиливает пролиферативный эффект фитогемагглютина на лимфоциты, полученные из крови ВИЧ-инфицированных пациентов [34]. Аналогичный эффект наблюдался при введении HS-1500 ВИЧ-положительным пациентам в дозе 4 г/сут в течение 2 нед. Наблюдаемая стимуляция пролиферации была связана с повышением продукции интерлейкина (ИЛ) 2 и экспрессией рецепторов ИЛ-2 вместе с уменьшением количества ИЛ-10 под действием HS-1500, что делает гуминовые кислоты потенциальными веществами для разработки многомишеневых микробицидов с анти-ВИЧ-активностью.

Еще одной перспективной группой микробицидов являются полисахарид-связывающие вещества. Особенностью этой группы является то, что ее представители относятся к природным пептидам. Основными представителями этой группы являются циановирин N (CVN), полученный из цианобактерий *Nostoc ellipsosporum*, и гриффитсин (GRFT), полученный из красных водорослей *Griffithsia*. Механизм действия микробицидов этой группы – связывание маннозных остатков на поверхности вириона с последующим ингибированием фузии. Эффективность данных белков в отношении ВИЧ-инфекции при ректальном и вагинальном введении была доказана в доклинических исследованиях [35].

Пептидные микробициды перспективны, так как возможно встроить ген, кодирующий данный пептид, в любой микроорганизм. В Национальном институте здоровья США (NIH) ведутся исследования по возможности колонизации влагалища женщин бактериями *Lactobacillus jensenii* со встроенным геном, продуцирующим белок циановирин N. Таким образом, микробицид на основе таких живых бактерий будет иметь несколько механизмов действия: способность связывать маннозные остатки на поверхности вириона и восстанавливать нормальную микрофлору влагалища.

Важной группой микробицидов являются композиции на основе ингибиторов репликации ВИЧ. Особенностью этой разнообразной по структуре группы является то, что активные вещества данных микробицидов уже показали свою эффективность в высокоактивной антиретровирусной терапии. Механизм действия сводится к ингибированию обратной транскрипции ВИЧ, в результате чего репликация вируса невозможна.

Одним из представителей ингибиторов репликации ВИЧ является дапивирин – нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы. На основе него был создан вагинальный гель, продемонстрировавший на этапе доклинических испытаний способность предотвращения заражения ВИЧ-инфекцией гуманизированных мышей [36].

Ярким представителем ингибиторов репликации ВИЧ является аналог аденозинмонофосфата – тенофовир (Viread). Как микробицидная композиция тенофовир выпускается в виде 1,0%-го вагинального геля. Тенофовир гель показал эффективность 39% в клинических испытаниях Центра по программе исследований СПИДа в Южной Африке (CAPRISA) в июле 2010 г. [37]. Сейчас проходит III фаза (FACTS-001) клинических испытаний данного препарата на 2 700 женщинах-добровольцах из девяти стран Южной Африки. Перспективны микробициды третьего поколения на основе комбинаций антиретровирусных препаратов: тенофовир / эмтрицитабин в форме вагинальных таблеток (закончена I фаза клинических испытаний CONRAD) и маравирик / дапивирин в форме вагинальных колец (закончена I фаза клинических испытаний Microbicides Trials Network).

Помимо природных пептидов были созданы синтетические аналоги хемокинового корцептора CCR5. Одним из таких препаратов является PSC-RANTES, показавший в доклинических испытаниях способность ингибирования химерного вируса SHIVsF162-p3 у макак при вагинальном заражении [38]. Дальнейшее развитие фармакологии микробицидов характеризуется созданием их наноразмерных форм [39] и политаргетных микробицидов, способных предотвращать заражение от нескольких вирусных заболеваний, передающихся половым путем, включая ВИЧ-инфекцию.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ КАНДИДАТНЫХ МИКРОБИЦИДОВ

На начало 2018 г. около 80 препаратов проходят стадию доклинических испытаний и около 10 микробицидов находятся на разных фазах клинических испытаний. Большинство микробицидов, находящихся в доклинических испытаниях, – это пептиды и белки природного происхождения, ингибиторы на основе антител, т. е. препараты четвертого поколения. Следует ожидать в ближайшее время выход на фармацевтический рынок микробицидов третьего поколения на основе ингибиторов обратной транскриптазы,

для которых закончена III фаза клинических испытаний. Препараты же четвертого поколения могут появиться на фармацевтическом рынке не ранее, чем через 15–20 лет, так как средняя продолжительность доклинических испытаний одного лекарственного препарата составляет 10–15 лет, а клинических испытаний – приблизительно 10 лет. Отсутствуют и четкие критерии перехода кандидатных микробицидов на уровень клинических испытаний.

В США, где активно ведется поиск новых анти-ВИЧ-агентов, Управлением контроля качества продуктов и лекарств (U.S. Food and Drug Administration (FDA)) установлены следующие критерии к доклиническим испытаниям микробицидов:

1. Десятидневный тест вагинальной ирритации на кроликах.
2. Определение времени системной циркуляции препарата (установление фармакокинетики и фармакодинамики препарата).
3. Общие токсикологические исследования.
4. Генетические и специфические токсикологические исследования.
5. Прочие фармакологические исследования.
6. Определение воздействия на репродуктивную систему.
7. Исследование канцерогенных свойств.
8. Аллергологические исследования (определение гиперчувствительности и фотосенсибилизации).

9. Исследование тестируемого микробицида на способность нарушать целостность презерватива.

В Российской Федерации официально ни один препарат еще не начал проходить стадию доклинических испытаний. Это связано с тем, что до сих пор не разработаны требования к исследованиям микробицидов и в нормативных документах термин «микробицид» отсутствует. Для отечественной фармакологии очень важным является разработка и утверждение экспериментальной модели трансмиссии ВИЧ-инфекции *in vitro*, которая бы отображала процессы, происходящие *in vivo*, а также создание алгоритма скрининга микробицидных препаратов. Это позволило бы начать доклинические испытания отечественных микробицидов и запустило бы процесс по их активной разработке. Экспериментальные модели для оценки эффективности микробицидных препаратов можно разделить на три группы: животные модели, тканевые экспланты и клеточные модели.

Экспериментальные модели тестирования микробицидов на животных очень сложны в исполнении по причине того, что ВИЧ поражает человека

и лишь некоторые виды обезьян. Моделирование инфекции на макаках *Macaca fascicularis* возможно с помощью ВИО или с помощью химерных вирусов SIV/HIV-1 [40]. Анатомия и физиология половых органов обезьян и людей схожи, но данная модель является высокобюджетной и не применима для рутинной практики тестирования кандидатных микробицидов. Учеными в США была разработана модель вагинальной ирритации на кроликах [41], позволяющая посмотреть действие препарата на стенки влагалища и оценить нарушения эпителиального слоя. Но данная модель требует проведения дополнительных тестов для оценки анти-ВИЧ-активности.

Современные методы позволяют тестировать анти-ВИЧ-активность на гуманизированных мышках линии BLT, с пересаженными от человека тканями красного костного мозга, печени и тимуса [42]. Мышиная модель достаточно точно повторяет человеческий патоген-специфический клеточный иммунный ответ, динамику выработки ВИЧ-1-специфических CD8⁺ Т-клеток во время острой фазы инфекции, а высокая скорость и воспроизводимость эволюции вирусного генома отражают процессы адаптации ВИЧ-1 к иммунному прессингу. Такая модель оптимальна для тестирования и открывает большие перспективы для изучения кандидатных микробицидов благодаря быстрому воспроизводству животных. Но требования к условиям содержания гуманизированных мышей остаются очень высокими.

Другой экспериментальной моделью тестирования микробицидов являются тканевые экспланты. Они позволяют моделировать эпителий влагалища или прямой кишки с подлежащими тканями. При этом используются ткани человеческого тела, что более точно воспроизводит инфекционный процесс. Такие модели позволяют оценить эффективность ингибиторов инфекции и репликации ВИЧ *ex vivo* [43]. Технически тканевый эксплант представляет собой участок эпителия шейки матки (многослойным плоский неороговевающий эпителий), влагалища (многослойный чешуйчатый эпителий) или прямой кишки (однослойный цилиндрический эпителий) с подлежащей соединительной тканью, окруженный плотной питательной средой (например, 3%-й агарозой или агар-агаром). На моделях вагинальных эксплантов были протестированы кандидатные микробициды дендримеры лизина (SPL7013), 1,2-бензолдикарбоксилат (CAP), производное каррагининов (PC-515), полимер нафталинсульфоната (PRO 2000), антимикробный пептид (D2A21), нуклеозидный ингибитор

обратной транскриптазы (UC781) [44]. Модели колоректальных эксплантов были использованы для тестирования кандидатных полианионных микробицидов PRO 2000 и DxS в отношении R5 ВИЧ-1. Эти модели также успешно используются для изучения иммунологии генитального тракта.

Наиболее популярными экспериментальными моделями при скрининге микробицидов являются клеточные модели *in vitro*. При моделировании трансмиссии ВИЧ распространение получили такие клеточные культуры, как клетки рака шейки матки MAGI, ME-180, HL2/3, или HeLa клетки, экспрессирующие tat и X4-тропный env ВИЧ-1, клетки рака матки HEC-1-A, колоректальные клетки Caco-2 и SW873, лимфобластоидные клетки лейкемии CEM-SS, клетки остеосаркомы GHOST(3) CD4-X4/R5, дендритные клетки cDC и pDC и многие другие [45]. До недавнего времени проблемой клеточных моделей тестирования микробицидов оставалось отсутствие количественного определения вирусной нагрузки. Для этого был разработан метод microbicide transmission and sterilization assay (MTSA) [46]. Данный метод позволил определять эффективную концентрацию микробицида, необходимую для полного подавления передачи вируса ВИЧ-1 в клеточной культуре, при этом было доказано, что ингибиторная активность микробицидов часто завышена. Таким образом, клеточные модели позволяют провести быстрый предварительный скрининг, выбрав из огромного числа кандидатных микробицидов те, которые необходимо тестировать на более дорогостоящих и сложно проводимых модельных экспериментах *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка микробицидов для профилактики ВИЧ-инфекции уже имеет свою 25-летнюю историю. Создание микробицидов является одним из главных направлений в биомедицинской профилактике ВИЧ-инфекции и СПИДа. Осуществление клинических испытаний кандидатных микробицидов – еще более сложная задача. Клинические испытания требуют большого количества добровольцев. В первую очередь это должны быть лица из групп риска, а именно занимающиеся коммерческим сексом или живущие с ВИЧ-инфицированным половым партнером. Кроме того, должен быть контроль добровольцев при применении кандидатных микробицидов в соответствии с режимом. Необходимо помнить, что клинические испытания требуют большого бюджета. Например, опыт США показывает, что стоимость III фазы клинических испытаний

составляет не менее 50–100 млн долларов. Помимо больших затрат на разработку препаратов, необходимо выявить максимально безопасные препараты для здоровья человека, так как исходя из предыдущих исследований, практически все микробициды, разработанные на данный момент, либо не эффективны, либо обладают слишком большим списком побочных реакций. Не всегда учитывается влияние кандидатных микробицидов на компоненты мукозального иммунного ответа. Обнадеживающим фактом является то, что микробициды – относительно недавно открытый класс соединений, и большинство форм еще не изучено или не синтезировано. В связи с этим можно сказать, что исследования в данной области только начинаются и, вполне вероятно, будут весьма перспективными.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Хаитов Р.М. СПИД. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018: 496. [Khaitov R.M. AIDS. 2nd edition, revised and supplemented. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2018: 496 (in Russ.).]
2. Карамов Э.В., Гашникова Н.М., Дроздов И.Г., Онищенко Г.Г. Мониторинг ВИЧ-инфекции в Евразии. Атлас вирусов иммунодефицита человека. Новосибирск: ЦЭРИС, 2009: 418. [Karamov E.V., Gashnikova N.M., Drozdov I.G., Onishchenko G.G. Monitoring of HIV infection in Eurasia. Atlas of human immunodeficiency viruses. Novosibirsk: TSERIS Publ., 2009: 418 (in Russ.).]
3. Weber J., Tatoud R., Fidler S. Postexposure prophylaxis, preexposure prophylaxis or universal test and treat: the strategic use of antiretroviral drugs to prevent HIV acquisition and transmission. *AIDS*. 2010; Suppl. 4: 27–39. DOI: 10.1097/01.aids.0000390705.73759.2c.
4. Stover J., Bertozzi S., Gutierrez J.P., Walker N., Stanecki K.A., Greener R., Gouws E., Hankins C., Garnett G.P., Salomon J.A., Boerma J.T., De Lay P., Ghys P.D. The global impact of scaling up HIV/AIDS prevention programs in low- and middle-income countries. *Science*. 2006; 311 (5766): 1474–1476. DOI: 10.1126/science.1121176.
5. Quinn T.C., Overbaugh J. HIV/AIDS in women: an expanding epidemic. *Science*. 2005; 308: 1582–1583. DOI: 10.1126/science.1112489.
6. Delva W., Abdool Karim Q. The HIV Epidemic in Southern Africa – Is an AIDS-Free Generation Possible? *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2014; 11 (2): 99–108. DOI: 10.1007/s11904-014-0205-0.
7. Гудима Г.О., Сидорович И.Г., Карамов Э.В., Хаитов Р.М. Современные стратегии биомедицинской профилактики ВИЧ-инфекции/СПИДа. Часть 1. Анти-ВИЧ/СПИД-вакцины и антиретровирусная терапия. *Иммунология*. 2013; 34 (1): 4–9. [Gudima G.O., Sidorovich I.G., Karamov E.V., Khaitov R.M. Modern strategies for biomedical HIV/AIDS prevention. Part 1. Anti-HIV/AIDS vaccines and antiretroviral therapy. *Immunology*. 2013; 34 (1): 4–9 (in Russ.).]
8. Grant R.M., Lama J.R., Anderson P.L., McMahan V., Liu A.Y., Vargas L., Goicochea P., Casapua M., Guanira-Carranza J.V., Ramirez-Cardich M.E., Montoya-Herrera O., Fernández T., Veloso V.G., Buchbinder S.P., Charialertsak S., Schechter M., Bekker L.G., Mayer K.H., Kallás E.G., Amico K.R., Mulligan K., Bushman L.R., Hance R.J., Ganoza C., Defechereux P., Postle B., Wang F., McConnell J.J., Zheng J.H., Lee J., Rooney J.F., Jaffe H.S., Martinez A.I., Burns D.N., Glidden D.V. iPrEx Study Team. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363 (27): 2587–2599. DOI: 10.1056/NEJMoa1011205.
9. Shattock R.J., Moore J.P. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 2003; 1 (1): 25–34. DOI: 10.1038/nrmicro729.
10. Mesman A.W., Geijtenbeek T.B. Pattern recognition receptors in HIV transmission. *Front. Immunol.* 2012; 3: 59. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00059.
11. Cunningham A.L., Harman A., Nasr N. Initial HIV mucosal infection and dendritic cells. *EMBO Mol. Med.* 2013; 5 (5): 658–660. DOI: 10.1002/emmm.201202763.
12. Ochsenbauer C., Edmonds T.G., Ding H., Keele B.F., Decker J., Salazar M.G., Salazar-Gonzalez J.F., Shattock R., Ayns B.F., Shaw G.M., Hahn B.H., Kappes J.C. Generation of transmitted/founder HIV-1 infectious molecular clones and characterization of their replication capacity in CD4 T lymphocytes and monocyte-derived macrophages. *J. Virol.* 2012; 86 (5): 2715–2728. DOI: 10.1128/JVI.06157-11.
13. Harman A.N., Kim M., Nasr N., Sandgren K.J., Cameron P.U. Tissue dendritic cells as portals for HIV entry. *Rev. Med. Virol.* 2013; 23 (5): 319–333. DOI: 10.1002/rmv.1753.
14. Parrish N.F., Gao F., Li H., Giorgi E.E., Barbian H.J., Parrish E.H., Zajic L., Iyer S.S., Decker J.M., Kumar A., Hora B., Berg A., Cai F., Hopper J., Denny T.N., Ding H., Ochsenbauer C., Kappes J.C., Galimidi R.P., West A.P. Jr., Bjorkman P.J., Wilen C.B., Doms R.W., O'Brien M., Bhardwaj N., Borrow P., Haynes B.F., Muldoon M., Theiler J.P., Korber B., Shaw G.M., Hahn B.H. Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110 (17): 6626–6633. DOI: 10.1073/pnas.1304288110.
15. Letvin N.L. Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6 (12): 930–939. DOI: 10.1038/nri1959.
16. Chang S.Y., Ko H.J., Kweon M.N. Mucosal dendritic cells shape mucosal immunity. *Exp. Mol. Med.* 2014; 46: e84. DOI: 10.1038/emm.2014.16.
17. Brandtzaeg P., Johansen F.E. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol. Rev.* 2005; 206: 32–63. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x.
18. Cerutti A., Chen K., Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu. Rev. Immunol.*

- mol. 2011; 29: 273–293. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101317.
19. Su B., Xu K., Lederle A., Peressin M., Biedma M.E., Laumond G., Schmidt S., Decoville T., Proust A., Lambotin M., Holl V., Moog C. Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes. *Blood*. 2012; 120 (18): 3708–3717. DOI: 10.1182/blood-2012-03-418913.
20. Patton D.L., Sweeney Y.T., Balkus J.E., Hillier S.L. Vaginal and rectal topical microbicide development: safety and efficacy of 1.0% Savvy (C31G) in the pigtailed macaque. *Sex Transm. Dis.* 2006; 33 (11): 691–695. DOI: 10.1097/01.qlq.0000216022.18321.d3.
21. Van Damme L., Ramjee G., Alary M., Vuylsteke B., Chandey V., Rees H., Sirivongrangsorn P., Mukenge-Tshibaka L., Ettiègne-Traoré V., Uaheowitchai C., Karim S.S., Mâsse B., Perrière J., Laga M.; COL-1492 Study Group. Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002; 360 (9338): 971–977. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)11079-8.
22. Peterson L., Nanda K., Opoku B.K., Ampofo W.K., Owusu-Amoako M., Boakye A.Y., Rountree W., Troxler A., Dominik R., Roddy R., Dorfänger L. SAVVY (C31G) gel for prevention of HIV infection in women: a Phase 3, double-blind, randomized, placebo-controlled trial in Ghana. *PLoS One*. 2007; 2 (12): e1312. DOI: 10.1371/journal.pone.0001312.
23. Piret J., Desormeaux A., Bergeron M.G. Sodium lauryl sulfate, a microbicides effective against enveloped and nonenveloped viruses. *Curr. Drug Targets*. 2002; 3 (1): 17–30. DOI: 10.2174/1389450023348037.
24. Zeitlin L., Hoen T.E., Achilles S.L., Hegarty T.A., Jerse A.E., Kreider J.W., Olmsted S.S., Whaley K.J., Cone R.A., Moench T.R. Tests of BufferGel for contraception and prevention of sexually transmitted diseases in animal models. *Sex Transm. Dis.* 2001. 28 (7): 417–423. DOI: 10.1097/00007435-200107000-00010.
25. Van De Wijgert J., Fullem A., Kelly C., Mehendale S., Rugpao S., Kumwenda N., Chirenje Z., Joshi S., Taha T., Padian N., Bollinger R., Nelson K. Phase 1 Trial of the Topical Microbicide BufferGel: Safety Results From Four International Sites. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2001; 26 (1): 21–27. DOI: 10.1097/00126334-200101010-00003.
26. Neurath A.R., Strick N., Li Y.Y. Anti-HTV-1 activity of anionic polymers: a comparative study of candidate microbicides. *BMC Infect. Dis.* 2002; 2: 27. DOI: 10.1186/1471-2334-2-27.
27. Skoler-Karppoff S., Ramjee G., Ahmed K., Altini L., Plagianos M.G., Friedland B., Govender S., De Kock A., Cassim N., Palanee T., Dozier G., Maguire R., Lahteenmaki P. Efficacy of Carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008; 372 (9654): 1977–1987. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61842-5.
28. Fletcher P.S., Wallace G.S., Mesquita P.M., Shattock R.J. Candidate polyanion microbicides inhibit HIV-1 infection and dissemination pathways in human cervical explants. *Retrovirology*. 2006; 3: 46. DOI: 10.1186/1742-4690-3-46.
29. Zhernov Y.V., Krem S., Helfer M., Schindler M., Harir M., Mueller C., Hertkorn N., Avvakumova N.P., Konstantinov A.I., Brack-Werner R., Schmitt-Kopplindg P., Perminova I.V. Supramolecular combinations of humic polyanions as potent microbicides with polymodal anti-HIV-activities. *New J. Chem.* 2017; 41: 212–224. DOI: 10.1039/C6NJ00960C.
30. Zhernov Y. Natural humic substances interfere with multiple stages of the replication cycle of human immunodeficiency virus. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2018; 141 (2): AB233. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.12.737.
31. Жернов Ю.В. Анализ цитотоксичности гуминовых веществ пелоидов. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2011; 13 (1): 1996–1998. [Zhernov Yu.V. Analysis of cytotoxicity of humic substances of peloids. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centr RAN*. 2011; 13 (39): 1996–1998 (in Russ.)].
32. Аввакумова Н.П., Жданова А.В., Глубокова М.Н., Жернов Ю.В. Влияние гуминовых кислот пелоидов на процессы свободнорадикального окисления. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2011; 13 (8): 1960–1963. [Avvakumova N.P., Zhdanova A.V., Glubokova M.N., Zhernov Yu.V. The effect of humic acids on the processes of free radical oxidation. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra RAN*. 2011; 13 (8): 1960–1963 (in Russ.)].
33. Schneider J., Weis R., Manner C., Kary B., Werner A., Seubert B.J., Riede U.N. Inhibition of HIV-1 in cell culture by synthetic humate analogues derived from hydroquinone: mechanism of inhibition. *Virology*. 1996; 218 (2): 389–395. DOI: 10.1006/viro.1996.0208.
34. Joone G.K., Dekker J., van Rensburg C.E. Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate. *Z. Naturforsch C*. 2003; 58 (3–4): 263–267. DOI: 10.1515/znc-2003-3-421.
35. O’Keefe B.R., Vojdani F., Buffa V., Shattock R.J., Montefiori D.C., Bakke J., Mirsalis J., d’Andrea A.L., Hume S.D., Bratcher B., Saucedo C.J., McMahon J.B., Pogue G.P., Palmer K.E. Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106 (15): 6099–6104. DOI: 10.1073/pnas.0901506106.
36. Di Fabio S., Van Roey J., Giannini G., van den Mooter G., Spada M., Binelli A., Pirillo M.F., Germinario E., Belardelli F., de Bethune M.P., Vella S. Inhibition of vaginal transmission of FIV-1 in hu-SCID mice by the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor TMC120 in a gel formulation. *AIDS*. 2003; 17 (11): 1597–1604. DOI: 10.1097/01.aids.0000072663.21517.63.
37. Abdool Karim Q., Abdool Karim S.S., Frohlich J.A., Grobler A.C., Baxter C., Mansoor L.E., Kharsany A.B.,

- Sibeko S., Mlisana K.P., Omar Z., Gengiah T.N., Maarschalk S., Arulappan N., Mlotshwa M., Morris L., Taylor D.; CAPRISA 004 Trial Group. Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science*. 2010; 329 (5996): 1168–1174. DOI: 10.1126/science.1193748.
38. Lederman M.M., Veazey R.S., Offord R., Mosier D.E., Dufour J., Mefford M., Piatak M. Jr., Lifson J.D., Sal-kowitz J.R., Rodriguez B., Blauvelt A., Hartley O. Pre-vention of vaginal SHIV transmission in rhesus macaques through inhibition of CCR5. *Science*. 2004; 306 (5695): 485–487. DOI: 10.1126/science.1099288.
 39. Adlin Jino Nesalina J., Anton Smith A. Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing zidovu-dine. *Asian. J. Pharm. Sci.* 2012; 7 (1): 80–84.
 40. Tsai C.C., Emau P., Jiang Y., Agy M.B., Shattock R.J., Schmidt A., Morton W.R., Gustafson K.R., Boyd M.R. Cyanovirin-N inhibits AIDS virus infec-tions in vaginal transmission models. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2004; 20 (1): 11–18. DOI: 10.1089/088922204322749459.
 41. Eckstein P., Jackson M.C., Millman N., Sobrero A.J. Comparison of vaginal tolerance tests of spermi-cidal preparations in rabbits and monkeys. *J. Reprod. Fertil.* 1969; 20 (1): 85–93.
 42. Dudek T.E., No D.C., Seung E., Vrbanc V.D., Fadda L., Bhoumik P., Boutwell C.L., Power K.A., Gladden A.D., Battis L., Mellors E.F., Tivey T.R., Gao X., Altfeld M., Luster A.D., Tager A.M., Allen T.M. Rapid Evolution of HIV-1 to Functional CD8+ T Cell Responses in Human-ized BLT Mice. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4 (143): 143ra98. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003984.
 43. Maher D., Wu X., Schacker T., Horbul J., Southern P. HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102 (32): 11504–11509. DOI: 10.1073/pnas.0500848102.
 44. Cummins J.E. Jr., Guarner J. Flowers L., Guenther P.C., Bartlett J., Morken T., Grohskopf L.A., Paxton L., Dez-zutti C.S. Preclinical testing of candidate topical micro-bicides for anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and toxicity in a human cervical explant culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51 (5): 1770–1779. DOI: 10.1128/AAC.01129-06.
 45. Lackman-Smith C., Osterling C., Luckenbaugh K., Man-kowski M., Snyder B., Lewis G., Paull J., Profy A., Ptak R.G., Buckheit R.W. Jr., Watson K.M., Cummins J.E. Jr., Sanders-Beer B.E. Development of a comprehensive hu-man immunodeficiency virus type 1 screening algorithm for discovery and preclinical testing of topical micro-bicides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52 (5): 1768–1781. DOI: 10.1128/AAC.01328-07.
 46. Watson K.M., Buckheit C.E., Buckheit R.W. Jr. Com-parative evaluation of virus transmission inhibition by dual-acting pyrimidinedione microbicides using the mi-crobicide transmission and sterilization assay. *Antimi-crob. Agents Chemother.* 2008; 52 (8): 2787–2796. DOI: 10.1128/AAC.01657-07.

Сведения об авторах

Жернов Юрий Владимирович, канд. мед. наук, зав. ла-бораторией врожденного иммунитета, Институт иммуно-логии, г. Москва. ORCID iD 0000-0001-8734-5527.

Хаитов Муса Рахимович, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Института иммуно-логии, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-4961-9640.

(✉) **Жернов Юрий Владимирович**, e-mail: y.zhernov@nrcii.ru.

Authors information

Zhernov Yuriy V., PhD, Head of the Laboratory of Innate Immunity, Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-8734-5527.

Khaitov Musa R., DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Director of Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-4961-9640.

(✉) **Zhernov Yuriy V.**, e-mail: y.zhernov@nrcii.ru.

Поступила в редакцию 19.09.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Received 19.09.2018
Accepted 17.12.2018

Моноциты при злокачественных новообразованиях: перспективы и точки приложения для диагностики и терапии

Патышева М.Р.¹, Стахеева М.Н.^{1,2,5}, Ларионова И.В.^{1,2}, Тарабановская Н.А.¹, Григорьева Е.С.^{1,2}, Слонимская Е.М.^{1,4}, Кжышковска Ю.Г.^{2,3}, Чердынцева Н.В.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

² Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

³ Университет Гейдельберга, Институт трансфузионной медицины и иммунологии
Германия, 68167, г. Маннхайм, Theodor-Kutzer-Ufer, 1-3

⁴ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

⁵ Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634009, г. Томск, пр. Ленина, 30

РЕЗЮМЕ

В процесс взаимодействия злокачественного новообразования и иммунной системы вовлечены эффекторы как адаптивного, так и врожденного звена иммунитета. Моноциты являются участниками неспецифической иммунной реакции и опосредуют свою основную функцию через пополнение пула опухолеассоциированных макрофагов, дендритных клеток и супрессорных клеток миелоидного происхождения, которые регулируют взаимоотношения инфильтрирующих опухоль-иммунокомпетентных клеток с опухолевыми клетками и с другими компонентами микроокружения, а также пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез, процессы диссеминации. Моноциты, будучи непосредственными участниками персистирующего воспаления, вовлекаются в реализацию его модулирующего воздействия на процесс развития опухоли.

Изучение молекулярных механизмов рекрутирования и дифференцировки моноцитов при злокачественных новообразованиях представляется перспективным направлением как с диагностической целью, так и в плане поиска таргетных молекул для управления макрофагами и дендритными клетками опухолевого микроокружения. В обзоре дана характеристика моноцитов периферической крови с учетом гетерогенности их популяции. Описаны значимые при онкологических заболеваниях Tie2+ и поляризованные по фенотипу макрофагов моноциты CD163+ и CD204+, а также ассоциированные с раком макрофагоподобные клетки (circulation cancer associated macrophage-like cells, CAMLs). Показано вовлечение субпопуляций моноцитов в патогенез онкологических заболеваний разных локализаций на этапах формирования предшественников моноцитов в костном мозге, циркуляции в периферической крови и дифференцировки в ткани опухоли.

Ключевые слова: иммуноонкология, субпопуляции моноцитов, диагностика, прогноз, иммунотерапия рака.

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

Источник финансирования. Работа поддержана грантами РФФИ № 17-29-06037, РНФ № 14-15-00350.

Для цитирования: Патышева М.Р., Стахеева М.Н., Ларионова И.В., Тарабановская Н.А., Григорьева Е.С., Слонимская Е.М., Кжышковская Ю.Г., Чердынцева Н.В. Моноциты при злокачественных новообразованиях: перспективы и точки приложения для диагностики и терапии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 76–83. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-76-83>.

УДК 616-006.6-097:612.112.95

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-76-83>

Monocytes and cancer: promising role as a diagnostic marker and application in therapy

Patysheva M.R.¹, Stakheeva M.N.^{1,2,5}, Larionova I.V.^{1,2}, Tarabanovskaya N.A.¹, Grigorieva E.S.^{1,2}, Slonimskaya E.M.^{1,4}, Kzhyshkowska J.G.^{2,3}, Cherdyntseva N.V.^{1,2}

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC) of the Russian Academy of Sciences (RAS) 5, Kooperativny Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

² National Research Tomsk State University (NR TSU) 36, Lenin Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

³ University of Heidelberg, Institute of Transfusion Medicine and Immunology 1-3, Theodor-Kutzer-Ufer Mannheim, 68167, Germany

⁴ Siberian State Medical University (SSMU) 2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

⁵ National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU) 30, Lenin Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Interrelationship between a malignant tumor and the immunity are provided by the involvement of both adaptive and innate immune systems. Monocytes are major participants in nonspecific immune response and mediate their key function through refilling the pool of tumor-associated macrophages, dendritic cells and myeloid suppressor cells. All these populations regulate the relationship of tumor-infiltrating immunocompetent cells with tumor cells and with other components of the microenvironment, as well as tumor cell proliferation, angiogenesis, and dissemination.

Monocytes, being direct participants of the chronic persistent inflammation, are involved in the inflammation impact on both tumor origin and progression. The study of the molecular mechanisms of monocyte recruitment and differentiation in malignant neoplasms seems to be a promising direction, both for a diagnostic purpose and as a search for targeting molecules for the control of macrophages and dendritic cells in the tumor microenvironment.

In this review, the characteristics of peripheral blood monocytes are given, taking into account the heterogeneity of their population. Tie2+ cells and macrophage-polarized CD163+ and CD204+ -monocytes, as well as cancer-associated macrophage-like cells (CAMLs), are described as contributors to cancer disease progression and outcome.

The involvement of monocyte subpopulations in the pathogenesis of oncological diseases of different localizations at the stages of the formation of monocyte precursors in the bone marrow, circulation in peripheral blood and differentiation in tumor tissue is shown.

Key words: immuno-oncology, monocyte subpopulations, prognosis, cancer immunotherapy.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This work was supported by RFBR grants No. 17-29-06037, RNF No. 14-15-00350.

For citation: Patysheva M.R., Stakheeva M.N., Larionova I.V., Tarabanovskaya N.A., Grigorieva E.S., Slonimskaya E.M., Kzhyshkowska J.G., Cherdyntseva N.V. Monocytes and cancer: promising role as diagnostic marker and target for the therapy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 76–83. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-76-83>.

ВВЕДЕНИЕ

В человеческом организме моноциты составляют 3–11% от всей лейкоцитарной массы. Несмотря на небольшое количество, они участвуют в ряде ключевых этапов неспецифического иммунного ответа, а также оказывают опосредованное влияние на специфический иммунный ответ. Наиболее изучен этот тип клеток у человека и лабораторных мышей. Однако данная популяция обнаружена не только у всех позвоночных животных, но и имеет схожих представителей в гемолимфе *Drosophila melanogaster* [1]. Попытки сравнить субпопуляции этих клеток у разных видов животных и у человека позволили провести параллель в формировании и распределении функциональных групп моноцитов [2]. Данный факт может свидетельствовать о достаточно раннем эволюционном появлении и организации моноцитов как эффекторов неспецифического иммунитета.

Основной функцией моноцитов в условиях нормы являются контроль целостности кровеносных сосудов и обновление популяции тканевых макрофагов и других клеточных популяций, принимающих участие в поддержании тканевого гомеостаза [3]. При различных патологических процессах, прежде всего, при воспалении, моноциты служат пластическим ресурсом для макрофагов, обеспечивающих элиминацию патогенов и регенерацию поврежденных тканей. Вовлечение моноцитов в реализацию механизмов острого и хронического воспаления позволило предложить использование их характеристик в качестве диагностических маркеров при заболеваниях, сопровождающихся хроническим воспалением [4], а именно при расстройствах сердечно-сосудистой системы [5, 6].

Участие моноцитов в патогенезе злокачественного роста также связано с пополнением различных клеточных популяций опухолевого микроокружения, таких как опухоль-ассоциированные макрофаги, супрессорные клетки миелоидного происхождения и определенная часть дендрит-

ных клеток. В настоящее время значение клеточного состава и функциональной ориентации (поляризации) опухолевого микроокружения для клинического течения онкологических заболеваний и эффективности проводимого противоопухолевого лечения обосновано целым рядом работ [7–11].

В обзоре представлен анализ научных данных об основных этапах развития и функционирования моноцитов с позиции вовлечения в патогенез злокачественного роста. Подобная оценка даст возможность выявить критические точки, направляющие дифференцировку моноцита в сторону содействия опухолевому росту и прогрессии. Изучение механизмов, лежащих в основе проопухолевой дифференцировки моноцита, позволит разработать терапевтические подходы для возможного направленного репрограммирования клеток моноцитарно-макрофагального ряда.

ФОРМИРОВАНИЕ МОНОЦИТОВ НА УРОВНЕ КОСТНОМОЗГОВОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА

Созревание моноцита начинается под действием специфических индукторов в костном мозге на уровне общего миелоидного предшественника с последующим развитием в клетки моноцитарной линии и их выходом в периферическую кровь с дальнейшей миграцией в ткани либо депонированием в селезенке. Основным индуктором моноцитопоеза является моноцитарный колониестимулирующий фактор (М-КСФ, Csf-1), в меньшей степени интерлейкин-3 (IL-3), гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), лимфотоксин- $\alpha 1\beta 2$, fms-подобная тирозинкиназа 3 (Flt3) [12–15]. Созревание моноцитов находится под совокупным влиянием индукторов моноцитопоеза, поступающих как из системного кровотока, так и из стромы костного мозга. Формирование клеток миелоидного ряда из костномозговых предшественников

и их дальнейшее функционирование происходят под контролем основного транскрипционного фактора *runx1* related transcriptional factors 1 (RUNX1). Последний, в свою очередь, контролирует синтез гемопоэтического транскрипционного фактора PU.1 из семейства транскрипционных факторов ETS, который руководит основными процессами организации генома и транскриптома моноцитов и макрофагов в целом [16].

Предполагается, что при наличии злокачественной опухоли функциональные и миграционные свойства миелоидных клеток могут изменяться. V. Cortez-Retamozo и соавт. (2012) в экспериментальных моделях рака легкого у мышей обнаружили изменения в развитии клеток миелоидного ряда в костном мозге [17]. В ходе данного эксперимента поздние предшественники миелоидных клеток пересаживали в селезенку, модулируя ускоренное созревание моноцитов, в результате чего размер опухолевых узлов увеличивался. На основании своих наблюдений авторы делают вывод о том, что супрессия клеток миелоидного ряда в костном мозге при раке может выступать в качестве механизма, ограничивающего рост опухоли.

Действительно, использование для подавления дифференцировки и выхода моноцитов из костного мозга антител, направленных против М-КСФ и ГМ-КСФ, а также мРНК и siРНК, участвующих в контроле экспрессии их генов, сопровождалось значимым снижением плотности инфильтрации опухоли моноцитами, уменьшением размера опухолевого узла и количества метастазов [18–21]. Однако имеются и противоположные наблюдения. Так, применение ГМ-КСФ для стимуляции у пациентов угнетенного проводимой цитостатической терапией гранулоцито- и моноцитопозеза приводило не только к восстановлению данных ростков кроветворения, но и к увеличению показателей выживаемости и качества жизни пациентов [22–24].

Влияние злокачественной опухоли на моноциты начинает проявляться на уровне генерации их ранних форм в костном мозге либо селезенке. Возможность применения различных иммунотерапевтических подходов, направленных на моноциты, находящиеся в стадии созревания, в данный момент изучается, однако эффекты подобных подходов пока не установлены.

ВЫХОД МОНОЦИТОВ В КРОВЕНОСНОЕ РУСЛО, МИГРАЦИЯ

Моноциты мобилизуются из костного мозга или селезенки по механизму хемотаксиса в ответ на воздействие хемокинов и цитокинов периферической крови. Наличие на поверхности хемо-

кинового CCR2, рецептора для главного хемоаттрактанта моноцитов (*monocyte chemoattractant protein 1*, MCP1), определяет способность этих клеток как выходить из костного мозга в кровеносное русло, так и проникать из циркуляции в ткань. Присутствие CCR2 на поверхности моноцитов различных субпопуляций выражено в разной степени: данный рецептор экспрессирован, в основном, на моноцитах, относящихся к классической и промежуточной субпопуляциям (таблица). A.S. Jaipersad (2014) предполагает активное участие CCR2-положительных клеток в процессе неоангиогенеза при формировании атеросклеротической бляшки [25].

Известно, что миграция моноцитов обеспечивается группами генов, экспрессия которых характерна как для клеток в спокойном состоянии, так и генами, активирующимися в процессе воспаления [26]. В экспериментах *in vitro* изменения экспрессии в процессе диапедеза затрагивали гены взаимодействия с эндотелиальными клетками: ген белка, связывающего эпидермальный фактор роста (EGFBR4), Е-селектин, фибронектин-1, тканевый ростовой фактор (CTGF), васкулярную молекулу клеточной адгезии-1 (VCAM-1), эфрин А1, тромбомодулин; гены адгезии и миграции: тканевая транглутаминаза-2, фактор хемотаксиса моноцитов (CCL2, MCP-1), матриксная металлопротеиназа-1 (MMP-1), гомологичный белок семейства Ras В (*rhoB*); гены, обеспечивающие фагоцитоз: IL-1 β , тканевая транглутаминаза-2, липополисахарид-ассоциированный протеин-2, кавеолин-1, CD74 (гамма-цепь главного комплекса гистосовместимости II класса), CD64 (Fc-рецептор к мономерным иммуноглобулинам IgG), молекула клеточной адгезии 2 (ICAM-2). Из них экспрессия максимально выражена у CCL2 (MCP-1) и IL-3 (CCL7) – двух наиболее мощных факторов хемотаксиса моноцитов. Последний факт свидетельствует о том, что мигрирующие клетки обладают способностью привлекать другие моноциты, так как могут секретировать хемоаттрактанты [27]. Однако в процессе миграции моноцитов, полученных из крови здоровых доноров, не отмечена активация генов, осуществляющих их дальнейшую дифференцировку в макрофаги или дендритные клетки. По-видимому, дифференцировка моноцитов не активируется одним процессом миграции, а требует дополнительных стимулов [28].

Известно, что при раке молочной железы повышение уровня CCL2 (MCP-1) как в ткани опухоли, так и в циркулирующей крови ассоциировано с плохим прогнозом [29, 30], в том числе с повы-

шением вероятности образования метастазов [31]. Подобные ассоциации установлены и для других локализаций опухолей (рак поджелудочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома, рак эндометрия): гиперэкспрессия CCL2 и(или) M-CSF ассоциирована с плохим прогнозом [32–35]. Показано, что клетки опухоли и опухолевого микроокружения также могут продуцировать растворимую форму CCL2, что потенциально способствует опухолевой прогрессии [36]. При этом повышение экспрессии миелоидных хемоаттрактантов в опухоли и увеличенный уровень моноцитов в периферической крови коррелировали со снижением показателей выживаемости пациентов, как и в исследованиях научных групп Т. Ueno, В. Mroczko и Н.О. Smith, упомянутых ранее [29, 34, 36].

Исходя из полученных данных, К.Ж. Pienta и S.K. Sandhu предложено использовать антитела к CCL2 в качестве таргетной иммунотерапии злокачественного новообразования. В настоящее время проводятся клинические испытания препарата CNTO 888 (карлумаб), который показал противоопухолевую активность и хорошую переносимость у больных с распространенной формой рака [37, 38]. Комбинации карлумаба с традиционной химиотерапией также изучаются в клинических испытаниях [39].

Однако недавние результаты показали, что после отмены анти-CCL2-терапии отмечены случаи усиления метастазирования. В модели рака молочной железы прерывание анти-CCL2-терапии было связано с увеличением выхода моноцитов из костного мозга, повышенной мобилизацией опухолевых клеток из первичного узла, увеличением инфильтрации их в зонах метастазов и усиленным ангиогенезом в опухолевой ткани под влиянием IL-6 и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [40].

ЦИРКУЛЯЦИЯ МОНОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

В клинических исследованиях у пациентов со злокачественными новообразованиями выявлено повышение количества циркулирующих в периферической крови моноцитов. Так, A.L. Feng и соавт. (2011) отметили увеличение числа моноцитов в крови на ранних стадиях рака молочной железы, что позволило им предложить математическую модель для использования этого показателя в целях ранней диагностики заболевания [41]. При некоторых злокачественных новообразованиях (саркоме, раке гортани человека) увеличение количества моноцитов связано с плохим прогнозом заболевания [42, 43].

Вышедшие в периферическую кровь и циркулирующие моноциты представляют собой неоднородный пул клеток, отличающихся по своим фенотипическим и функциональным свойствам. Первые данные о гетерогенности популяции моноцитов в физиологических условиях появились в 1980-х гг. [44]. В 2010 г. международной группой экспертов, входящих в состав International Union of Immunological Societies (IUIS), при поддержке Всемирной организации здравоохранения была утверждена официальная классификация, основанная на оценке молекул CD14 (рецептора к липополисахаридам бактериальной стенки) и CD16 (компонента рецепторного комплекса к IgG) [45]. Согласно классификации, были выделены три группы: CD14⁺⁺CD16[–] – классические, CD14⁺⁺CD16⁺ – промежуточные и CD14⁺CD16⁺⁺ – неклассические моноциты, каждая из которых имеет свои фенотипические и функциональные особенности (см. табл. 1). Известно, что патологический процесс, например инфекции, сердечно-сосудистые заболевания, действие глюкокортикоидов сопровождаются изменением количественного соотношения субпопуляций моноцитов в периферической крови, что, вероятно, может служить диагностическим маркером [46–48].

Результаты транскриптомного анализа разных субпопуляций моноцитов неоднозначны. Так, исследователь J. Cross выявил схожесть экспрессионного профиля классических и промежуточных моноцитов [52]. Однако по результатам двух других исследований, напротив, совпадают профили экспрессии генов промежуточной и неклассической субпопуляций [53, 54]. По мнению K.L. Wong, выявленное противоречие объясняется способностью моноцитов к пластичному переходу из одного состояния в другое, и, как следствие, лабильностью экспрессионного профиля клеток [55]. Некоторые исследователи полагают, что клетки неклассической группы являются более зрелой стадией моноцитопоэза [54].

Соотношение основных фракций моноцитов при определенных локализациях злокачественных новообразований изменяется. Так, при раке желудка и толстого кишечника установлено четырехкратное увеличение количества клеток моноцитарной субпопуляции CD16⁺ и CD14⁺CD16⁺ по сравнению со здоровыми лицами [56, 57]. С. Subimerb и соавт. (2010) отмечено трехкратное повышение субпопуляции CD16⁺ при холангиокарциноме, ассоциированное с более выраженной инфильтрацией ткани опухоли опухолеассоциированными макрофагами.

Характеристика основных субпопуляций моноцитов человека Characteristics of the main human monocyte subpopulations			
Показатель Indicator	Классические моноциты Classical monocytes	Промежуточные моноциты Intermediate monocytes	Неклассические моноциты Non-classical monocytes
Соотношение фракций среди моноцитов, % The ratio of fractions among monocytes, %	85–90	4–5	10–15
Основные поверхностные маркеры Main surface markers	CD14++CD16–	CD14++CD16+	CD14+CD16++
Дополнительные поверхностные маркеры Additional surface markers	CCR2+, CC32++, CD64++, CD163++, CD204+, IL-6 (IL6R++), хемокиновые рецепторы фракталикина CX3CR1+, CXCR4+ [49–51]. CCR2+, CC32++, CD64++, CD163++, CD204+, IL-6 (IL6R++), chemokine receptors fractalkine (CX3CR1+), CXCR4+ [49–51]	CCR2+, CC32+, CD64++, CD163++, CD204+, IL6R++, хемокиновые рецепторы фракталикина (CX3CR1++), CXCR4++ [49–51]. CCR2+, CC32+, CD64++, CD163++, CD204+, IL6R++, chemokine receptors fractalkine (CX3CR1+), CXCR4+ [49–51]	CCR2+, CC32+, CD64+, CD163+, CD204++, IL6R+, хемокиновые рецепторы фракталикина (CX3CR1++), CXCR4+ [49–51]. CCR2+, CC32+, CD64+, CD163+, CD204++, IL6R+, chemokine receptors fractalkine (CX3CR1++), CXCR4+ [49–51]
Отличительные особенности Distinctive features	Высокая фагоцитарная активность, активная миграция по MCP1/MCP1–рецепторному градиенту в воспаленные ткани, высокий уровень миелопероксидазной активности и антитело-зависимая клеточная цитотоксичность. High phagocytic activity, active migration by MCP1 / MCP1 – receptor gradient into inflamed tissues, high levels of myeloperoxidase activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity	Высокий уровень экспрессии рецепторов ангиогенеза. High level of expression of angiogenesis receptors	Высокий уровень экспрессии главного комплекса гистосовместимости 2 (HLA-DR), миграция по MCP1-независимому пути преимущественно за счет фракталикина (CX3CR1), в основном в тканях без воспаления, предположительно поддерживает целостность тканей, более вероятный предшественник дендритных клеток [50]. The high expression level of the major histocompatibility complex 2 (HLA-DR), migration along the MCP1-independent pathway, mainly due to fractalkine (CX3CR1) mainly in tissues without inflammation, presumably maintains the integrity of the tissues, a more likely precursor of dendritic cells [50]
Функции Functions	Фагоцитоз; «уборка» некротического дебриса; выделение активных форм кислорода и металлопротеаз для эпителиально-мезенхимального ремоделирования; продукция провоспалительных цитокинов. Phagocytosis; “Cleaning” of necrotic debris; release of reactive oxygen species and metalloproteases for epithelial-mesenchymal remodeling; pro-inflammatory cytokine products	Фагоцитоз, ангиогенез, противовоспалительная активность. Phagocytosis, angiogenesis, anti-inflammatory activity	Коллагенизация, заживление, противовоспалительные эффекты. Collagenization, healing, anti-inflammatory effects
Продукция цитокинов Cytokine production	Высокий уровень продукции фактора некроза опухоли альфа (TNFα), IL-1β, MCP1, IL-6. High production of tumor necrosis factor alpha (TNFα), IL-1β, MCP1, IL-6	Низкий уровень продукции цитокинов. Low cytokine production	Высокий уровень продукции TNFα, IL-1β, IL-6, IL-12. High level of production of TNFα, IL-1β, IL-6, IL-12

Оперативное удаление опухоли приводило к снижению количества CD16+ в крови [58].

Влияние опухоли отражается не только на фенотипическом составе моноцитов периферической крови, но и затрагивает экспрессию генов в данных клетках. Так, А. Намм и соавт. (2016) описывают дистанционное влияние рака толстой кишки на моноциты CD14+, детектированное посредством анализа изменений в транскриптоме клетки. В работе обнаружены паттерны экспрессированных генов, которые могут служить маркерами для выявления рака толстой кишки и мониторинга эффективности его лечения [59].

Наличие рецептора к фракталкину CX3CR1 определяет способность моноцитов поддерживать целостность эндотелия и гомеостаз сосудистой стенки в целом. CX3CR1-положительные моноциты оказывают противовоспалительный эффект и осуществляют процессы заживления, CX3CR1-отрицательным клеткам отводится роль эффекторов воспалительного процесса [60].

Одной из наиболее важных субпопуляций моноцитов при онкологических заболеваниях являются клетки, экспрессирующие рецептор ангиопоэтина 2 (моноциты Tie2+). Эти проангиогенные моноциты рекрутируются в спонтанные и индуцированные опухоли и стимулируют ангиогенез по принципу паракринной регуляции [61]. По мнению S.B. Coffelt и соавт. (2010), моноциты Tie2+ уже в циркуляции являются препрограммированными для осуществления проангиогенных функций, что проявляется в повышенном уровне экспрессии матриксной металлопротеиназы 9 (MMP9), фактора роста эндотелия сосудов альфа ((VEGF-A)), циклооксигеназы 2 (COX-2) и белков семейств Wnt (-Wnt5a) [62].

В экспериментальных моделях рака молочной железы у мышей была показана способность моноцитов Tie2+ стимулировать ангиогенез опухоли, а в опухолях молочной железы количество моноцитов Tie2+ положительно коррелировало со степенью васкуляризации злокачественного узла [63–65]. В периферической крови онкологических больных моноциты Tie2+ входят в группу так называемых васкулярных лейкоцитарных клеток (VLC), которые отличаются повышенной продукцией индукторов васкуляризации группы VEGF. При раке яичника большинство клеток этой группы составляют моноциты Tie2+ [66].

Способность моноцитов Tie2+ стимулировать ангиогенез опухоли определяет их прогностическую ценность. Показано, что повышение инфильтрации опухоли Tie2+ связано с появлением метастазов рака молочной железы [67], а

повышение количества моноцитов Tie2+ в периферической крови у больных раком молочной железы в ассоциации с повышением на них экспрессии рецептора с тирозинкиназной активностью, активируемый сигнальным белком VEGF1 (VEGFR-1) и увеличением экспрессии ангиопоэтина-2 и плацентарным фактором роста 1 (PlGF) в опухоли, отрицательно коррелировало с длительностью безрецидивной выживаемости [68]. У больных раком почки увеличение инфильтрации опухоли моноцитами Tie2+ положительно коррелировало с размером опухоли, распространенностью процесса и выраженностью метастазирования [69]. Повышенный уровень моноцитов Tie2+ в опухоли толстого кишечника наблюдался даже при применении анти-VEGF-препаратов в совокупности со стандартной схемой химиотерапии [70]. Известно, что при глиобластомах инфильтрирующие моноциты Tie2+ ассоциированы с инвазивными глиобластомами и локализуются на периферии опухоли, плотность инфильтрации предложено использовать в качестве маркера резистентности опухоли к антиангиогенной терапии [71].

В литературе представлены разные мнения по поводу того, входят ли Tie2+ моноциты в субпопуляцию клеток CD14+ клеток. Субпопуляция моноцитов CD14+Tie2+ выявлена при раке яичников и толстой кишки [72]. У больных колоректальным раком количество Tie2-рецепторов на моноцитах CD14+ статистически достоверно было выше аналогичного показателя у здоровых доноров [73]. Однако существует мнение, что моноциты Tie2+ являются отдельной популяцией клеток [74].

Существует гипотеза о том, что моноциты, находясь в периферической крови, могут быть подвержены дистантному воздействию тех же индукторов, как показано в экспериментах *in vitro*. В ответ на воздействие они могут формировать фенотип, подобный макрофагам, поляризоваться по типу макрофагов, которые способствуют васкуляризации опухолевой ткани, образованию метастазов, иммуносупрессии, либо активировать стволовые опухолевые клетки [75].

Связь моноцитов, циркулирующих в крови, и макрофагов, реализующих свою функцию в ткани, наиболее вероятно опосредована феноменом неспецифической иммунологической памяти [76]. Этот механизм заключается в том, что моноциты под действием системных факторов, появляющихся в циркуляции при наличии локального воспаления, приобретают определенный эпигенетический профиль, в частности за счет механиз-

мов метилирования, который оказывает влияние на их дальнейшую дифференцировку в очаге патологического процесса [77–79]. Наиболее изучен данный феномен при контакте эффекторов неспецифического иммунитета с активаторами бактериального происхождения [77]. Существуют данные об изменении эпигенетического статуса моноцитов при воздействии липопротеинов низкой плотности и повышенном уровне глюкозы в периферической крови [80, 81]. Участвует ли данный механизм в поляризации моноцитов при заболеваниях, сопровождающихся воспалением, на сегодняшний день не выяснено.

Данные о наличии поляризованных моноцитов в периферической крови у больных со злокачественными новообразованиями немногочисленны. Так, S.A. Almatrodi и соавт. (2014) сообщают, что при немелкоклеточном раке легкого не выявлено различий в содержании моноцитов с фенотипами CD14+CD204+ и CD14+CD163+, CD14+CD36+, характеризующими M2-поляризацию, между больными и здоровыми лицами [82]. При этом увеличение моноцитов CD14+CD204+ в крови из легочной вены, взятой во время удаления опухоли легкого, достоверно связано с ранним рецидивом болезни [83]. B. Zang и соавт. (2017), напротив, выявили, что содержание моноцитов CD14+CD163+ и CD14+CD204+ при раке молочной железы было значительно выше соответствующих показателей у здоровых лиц и связано с размером и распространенностью опухоли. При этом чувствительность и специфичность использования данных показателей в качестве диагностических маркеров превышают таковые для классических онкомаркеров – ракового эмбрионального антигена и CA-15-3 [84]. В циркулирующей крови онкологических пациентов обнаружены моноцитарные клетки с фенотипом тканевых макрофагов, которые получили название ассоциированных с раком макрофагоподобных клеток (circulation cancer associated macrophage-like cells, CAMLs) [85]. Полагают, что данная популяция появляется в результате выхода макрофагов из опухоли в кровь подобно циркулирующим опухолевым клеткам. CAMLs обнаружены исключительно у пациентов со злокачественными новообразованиями, что открывает перспективу их использования в качестве маркера диагностики и мониторинга течения заболевания [86].

Вклад этих популяций моноцитов в патогенез злокачественных опухолей связан с продукцией ими цитокинов и хемокинов, с одной стороны, поддерживающих хроническое персистирующее воспаление при опухолевом процессе, а с другой

– рекрутирующих новые популяции клеток иммунной системы из костного мозга в опухоль и возможные сайты отдаленного метастазирования.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МОНОЦИТОВ В ОПУХОЛИ

Несмотря на ряд эффектов, таких как осуществление фагоцитоза и регуляторных функций посредством цитокинов, которые моноциты осуществляют в кровотоке [87–90], основная их функция – это миграция и последующая направленная дифференцировка в тканях.

Ранее, согласно классической теории R. van Furth, считалось, что макрофаги и дендритные клетки (в том числе и опухолевого микроокружения) имеют костномозговое происхождение и образуются при миграции их предшественников – моноцитов – в периферические органы [91].

В настоящее время известно, что в основном резидентные макрофаги, заселяющие большинство периферических органов и тканей, за исключением макрофагов кишечника, происходят из эмбрионального желточного мешка. В течение жизни индивида обновление пула тканевых макрофагов в условиях нормы происходит за счет этой популяции клеток [92]. Однако в условиях патологического процесса моноциты костномозгового происхождения оказываются вовлеченными в процесс пополнения популяции тканевых макрофагов [93]. Так, показано, что патоген-ассоциированное инфекционное воспаление реализуется с участием макрофагов костномозгового происхождения [94].

Развитие злокачественного новообразования также приводит к вовлечению моноцитов в пополнение популяции тканевых макрофагов. Данные, полученные на модели перевиваемых опухолей у мышей, показывают, что опухолеассоциированные макрофаги как в первичных опухолевых узлах, так и в метастазах происходят из моноцитов-предшественников [95–98]. Следует отметить, что моноциты – предшественники макрофагов – могут иметь не только костномозговое происхождение, но и быть рекрутированными из селезенки [17]. В моделях экспериментальных опухолей их микроокружение содержит значительное количество моноцитов Ly6C++, соответствующих CD14++ клеткам человека. Именно эта субпопуляция является предшественником опухолеассоциированных макрофагов и дендритных клеток [95, 99, 100].

В работах S. Baron и соавт. (2011) и M. Bögel и соавт. (2012) представлены данные о том, что не только наличие опухоли, но ее гистологический

тип влияет на свойства моноцитов. Исследователи объясняют полученные данные тем, что разные по происхождению опухоли продуцируют разные модуляторы функций моноцитов [101, 102].

К настоящему моменту вопрос о том, насколько значим вклад моноцитов в пополнение основного пула опухолеассоциированных макрофагов, остается открытым. Высказываются предположения о том, что статус моноцитов в периферической крови может определять свойства, которые проявят в опухоли тканевые макрофаги [103].

В несколько меньшей степени моноциты связаны с опухолевыми дендритными клетками. В физиологическом состоянии основной пул тканевых дендритных клеток в дополнение к дендритным клеткам, заселившим ткани в процессе эмбриогенеза, пополняется предшественниками дендритных клеток плазмацитоидного происхождения. В случае злокачественного роста часть дендритных клеток имеет предшественников моноцитарного происхождения [104, 105]. Данное обстоятельство нашло практическое применение в индукции дендритных клеток из моноцитов *ex vivo* для последующей иммунотерапии рака молочной железы в исследованиях B.D. Roberson (Национальный институт здоровья (NIH), США), вакцинотерапии рака простаты (Center for Cancer Immune Therapy, Дания) и множестве других [106, 107]. Интересно, что при получении дендритных клеток моноциты у больных со злокачественными новообразованиями отличались от моноцитов здоровых доноров [108, 109]. Этот феномен авторы объясняют доминированием субпопуляции клеток CD14+HLA-DR^{low}/neg у онкологических пациентов и сниженной способностью последних переходить в дендритные клетки [109]. Кроме того, эти моноциты являются иммуносупрессорами и способны ингибировать пролиферацию Т-лимфоцитов и созревание дендритных клеток [108, 110–114].

Наименее изучена связь моноцитов с супрессорными клетками миелоидного происхождения, основным свойством которых является подавление противоопухолевого иммунного ответа. Показано, что предшественниками супрессорных клеток миелоидного происхождения были как гранулоциты, так и моноциты, формируя в ткани гетерогенную популяцию [115].

Результаты ряда исследований подтверждают возможность использования моноцитов для противоопухолевой иммунотерапии, при этом помимо применения в вакцинотерапии, моноциты могут сами выступать в роли мишеней для терапевтических воздействий, как системно, так и

ex vivo. Попытка активации противоопухолевого иммунитета путем стимуляции моноцитов больных с раком яичников препаратом Sylatron (рекомбинантный IFN α) в настоящее время ведется в NIH, США [116]. Показана терапевтическая эффективность препарата трабедектина, который непосредственно убивает моноциты (макрофаги), и одобрен в Европе для лечения саркомы и рака яичников [117].

Таким образом, результаты исследований показали, что моноциты периферической крови, тканевые макрофаги, дендритные клетки, а также супрессоры миелоидного происхождения микроокружения опухоли связаны между собой. Выяснение биологических механизмов такой связи позволит уточнить патогенетические закономерности взаимодействия иммунной системы и злокачественного новообразования, что открывает перспективы для поиска эффективных мишеней для иммунотерапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Злокачественная опухоль, начиная от гемопоэтических предшественников до функционально поляризованных тканевых макрофагов, посредством различных механизмов оказывает влияние на клетки моноцитарно-макрофагального ряда. На различных этапах развития моноцита факторы доминирующего влияния сменяют друг друга, что предполагает возможность искусственного «торможения» или «ускорения» генерации различных этапов дифференцировки данной популяции в зависимости от терапевтической целесообразности.

Установленные взаимосвязи между присутствием определенных популяций моноцитов в периферической крови и наличием злокачественного новообразования предполагают их диагностическую ценность для практической оценки. Однако необходимо учитывать гетерогенность популяции этих клеток (по аналогии с лимфоцитами). Возможно, значимой для диагностики является какая-то определенная подгруппа моноцитов, либо соотношение разных подгрупп клеток в общей популяции.

Доказанное вовлечение в патогенез злокачественного роста, прежде всего, стимуляция ангиогенеза и пластический ресурс для клеток опухолевого микроокружения, делает моноциты, с одной стороны, перспективными маркерами прогноза клинического течения онкологических заболеваний, с другой стороны, позволяет рассматривать их в качестве потенциальных терапевтических мишеней. Однако многие условия

и механизмы дифференцировки разнообразных популяций моноцитов в функционально поляризованные клетки опухолевого микроокружения остаются малоизвестными и требуют детального изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Williams M.J. Drosophila hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol.* 2007; 178 (8): 4711–4716. DOI: 10.4049/jimmunol.178.8.4711.
- Ziegler-Heitbrock L. Blood monocytes and their subsets: established features and open questions. *Frontiers in Immunology.* 2015; 6: 423. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00423.
- Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013; 496 (7446): 445–455. DOI: 10.1038/nature12034.
- Kzhyshkowska J., Gudima A., Moganti K., Gratchev A., Orekhov A. Perspectives for monocyte/macrophage-based diagnostics of chronic inflammation. *Transfus. Med. Hemother.* 2016; 43 (2): 66–77. DOI: 10.1159/000444943.
- Mosig S., Rennert K., Krause S., Kzhyshkowska J., Neunübel K., Heller R., Funke H. Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14⁺ CD16⁺ monocytes in detoxification of oxidized LDL. *Fasber J.* 2009; 23 (3): 866–874. DOI: 10.1096/fj.08-118240.
- Hristov M., Weber C. Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* 2011; 106 (5): 757–762. DOI: 10.1160/TH11-07-0500.
- Grivennikov S. and Karin M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2010; February; 20 (1): 65. DOI: 10.1016/j.gde.2009.11.004.
- Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011; 8 (3): 151–160. DOI: 10.1038/nrclinonc.2010.223.
- Таширева А.А., Перельмутер В.М., Манских В.Н., Денисов Е.В., Савельева О.Е., Кайгородова Е.В., Завьялова М.В. Типы иммунновоспалительных реакций как алгоритмы взаимодействия клеток в условиях репаративной регенерации и опухолевого роста. *Биохимия.* 2017; 82 (5): 542–555. [Tashireva L. A, Perelmuter. V.M., Manskikh V.N., Denisov E.V., Saveliyeva O.E., Kaygorodova E.V., Zavyalova M.V. Types of immune inflammatory responses as a reflection of cell-cell interactions in tissue regeneration and tumor growth – *Biochemistry.* 2017; 82 (5): 542–555 (in Russ.)]. DOI: 10.1134/s0006297917050029.
- Stakheyeva M., Riabov V., Mitrofanova I., Litviakov N., Choyzonov E., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. Role of the immune component of tumor microenvironment in the efficiency of cancer treatment: perspectives for the personalized therapy. *Curr. Pharm. Des.* 2017; 23: 32. DOI: 10.2174/1381612823666170714161703.
- Buldaikov M., Zavyalova M., Krakhmal N., Telegina N., Vtorushin S., Mitrofanova I., Riabov V., Yin S., Song B., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. CD68⁺, but not statilin-1⁺ tumor associated macrophages in gaps of ductal tumor structures negatively correlate with the lymphatic metastasis in human breast cancer. *Immunobiology.* 2017; 222 (1): 31–38. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.09.011.
- Little M.C., Hurst R.J., Else K.J. Dynamic changes in macrophage activation and proliferation during the development and resolution of intestinal inflammation. *J. Immunol.* 2014; 193 (9): 4684–4695. DOI: 10.4049/jimmunol.1400502.
- Waskow C., Liu K., Darrasse-Jeze G., Guernonprez P., Ginhoux F. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 2008; 9 (6): 676–683. DOI: 10.1038/ni.1615.
- Kabashima K., Banks T.A., Ansel K.M., Lu T.T., Ware C.F., Cyster J.G. Intrinsic lymphotoxin- β receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity.* 2005; 22 (4): 439–450. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.02.007.
- Iwasaki H., Akashi K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity.* 2007; 26 (6): 726–740. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.06.004.
- Lawrence T., Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature Reviews Immunology.* 2011; 11 (11): 750–761. DOI: 10.1038/nri3088.
- Cortez-Retamozo V., Etzrodt M., Newton A., Rauch P.J., Chudnovskiy A., Berger C., Ryan R.J., Iwamoto Y., Marinelli B., Gorbato R., Forghani R., Novobrantseva T.I., Koteliensky V., Figueiredo J.L., Chen J.W., Anderson D.G., Nahrendorf M., Swirski F.K., Weissleder R., Pittet M.J. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012; 109 (7): 2491–2496. DOI: 10.1073/pnas.1113744109.
- Qian B.Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010; 141 (1): 39–51. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.014.
- Aharinejad S., Paulus P., Sioud M., Hofmann M., Zins K., Schäfer R., Stanley E.R., Abraham D. Colony-stimulating factor-1 blockade by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice. *Cancer Res.* 2004; 64 (15): 5378–5384. DOI: 10.1158/0008-5472.
- Paulus P., Stanley E.R., Schafer R., Abraham D., Aharinejad S. Colony-stimulating factor-1 antibody reverses chemoresistance in human MCF-7 breast cancer xenografts. *Cancer Res.* 2006; 66 (8): 4349–4356. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3523.
- De Nardo D.G., Brennan D.J., Rexhepaj E., Ruffell B., Shiao S.L., Madden S.F., Gallagher W.M., Wadhwani N., Keil S.D., Junaid S.A., Rugo H.S., Hwang E.S., Jirstrom K., West B.L., Coussens L.M. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* 2011; 1 (1): 54–67. DOI: 10.1158/2159-8274.CD-10-0028.

22. Schmeler K.M., Vadhan-Raj S., Ramirez P.T., Apte S.M., Cohen L., Bassett R.L., Iyer R.B., Wolf J.K., Levenback C.L., Gershenson D.M., Freedman R.S. A phase II study of GM-CSF and rIFN-gamma1b plus carboplatin for the treatment of recurrent, platinum-sensitive ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer. *Gynecol Oncol.* 2009; 113 (2): 210–215. DOI: 10.1016/j.ygyno.2009.02.007.
23. Spitler L.E., Grossbard M.L., Ernstoff M.S., Silver G., Jacobs M., Hayes F.A., Soong S.J. Adjuvant therapy of stage III and IV malignant melanoma using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18 (8): 1614–1621. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.8.1614.
24. Pinedo H.M., Buter J., Luyckx de Bakker S.A., Pohlmann P.R., van Hensbergen Y., Heideman D.A., van Diest P.J., de Gruijl T.D., van der Wall E. Extended neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer combined with GM-CSF: effect on tumour-draining lymph node dendritic cells. *Eur. J. Cancer.* 2003; 39 (8): 1061–1067. DOI: 10.1016/s0959-8049(03)00131-x.
25. Jaipersad A.S., Lip G.Y., Silverman S., Shantsila E. The Role of Monocytes in Angiogenesis and Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology.* 2014; 63 (1): 1–11. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.09.019.
26. Srivastava M., Jung S., Wilhelm J., Fink L., Böhling F., Welte T., Bohle R.M., Seeger W., Lohmeyer J., Maus U.A. The inflammatory versus constitutive trafficking of mononuclear phagocytes into the alveolar space of mice is associated with drastic changes in their gene expression profiles. *J. Immunol.* 2005; 175 (3): 1884–1893. DOI: 10.4049/jimmunol.175.3.1884.
27. Thomas-Ecker S., Lindecke A., Hatzmann W., Kaltschmidt C., Zänker K.S., Dittmar T. Alteration in the gene expression pattern of primary monocytes after adhesion to endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007; 104 (13): 5539–5544. DOI: 10.1073/pnas.0700732104.
28. Gerhardt T., Ley K. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc. Res.* 2015; 107 (3): 321–330. DOI: 10.1093/cvr/cvv147.
29. Ueno T., Toi M., Saji H., Muta M., Bando H., Kuroi K., Koike M., Inadera H., Matsushima K. Significance of macrophage chemoattractant protein 1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6 (8): 3282–3289.
30. Lebrecht A., Grimm C., Lantzsch T., Ludwig E., Heffler L., Ulbrich E. Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients with breast cancer. *Tumour Biol.* 2004; 25 (1–2): 14–17. DOI: 10.1159/000077718.
31. Qian B.Z., Li J., Zhang H., Kitamura T., Zhang J., Campion L.R. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.* 2011; 475 (7355): 222–225. DOI: 10.1038/nature10138.
32. Groblewska M., Mroczko B., Wereszczyńska-Siemiakowska U., Myśliwiec P., Kedra B., Szmitkowski M. Serum levels of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in pancreatic cancer patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007; 45 (1): 30–34. DOI: 10.1515/CCLM.2007.025.
33. Mroczko B., Groblewska M., Wereszczyńska-Siemiakowska U., Okulczyk B., Kedra B., Łaszewicz W., Dabrowski A., Szmitkowski M. Serum macrophage-colony stimulating factor levels in colorectal cancer patients correlate with lymph node metastasis and poor prognosis. *Clin. Chim. Acta.* 2007; 380 (1–2): 208–212. DOI: 10.1016/j.cca.2007.02.037.
34. Zhu X.D., Zhang J.B., Zhuang P.Y., Zhu H.G., Zhang W., Xiong Y.Q., Wu W.Z., Wang L., Tang Z.Y., Sun H.C. High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26 (16): 2707–2716. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.6521.
35. Smith H.O., Anderson P.S., Kuo D.Y., Goldberg G.L., DeVitoria C.L., Boock C.A., Jones J.G., Runowicz C.D., Stanley E.R., Pollard J.W. The role of colony-stimulating factor 1 and its receptor in the etiopathogenesis of endometrial adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 1995; 1 (3): 313–325.
36. Steiner J.L., Murphy E.A. Importance of chemokine (CC-motif) ligand 2 in breast cancer. *The International Journal of Biological Markers.* 2012; 27 (3): 179–185. DOI: 10.5301/JBM.2012.9345.
37. Pienta K.J., Machiels J.P., Schrijvers D., Alekseev B., Shkolnik M., Crabb S.J., Li S., Seetharam S., Puchalski T.A., Takimoto C., Elsayed Y., Dawkins F., de Bono J.S. Phase 2 study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 (CCL2), in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Invest New Drugs.* 2013; 31 (3): 760–768. DOI: 10.1007/s10637-012-9869-8.
28. Sandhu S.K., Papadopoulos K., Fong P.C., Patnaik A., Messiou C., Olmos D., Wang G., Tromp B.J., Puchalski T.A., Balkwill F., Berns B., Seetharam S., de Bono J.S., Tolcher A.W. A first-in-human, first-in-class, phase I study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 in patients with solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2013; 71 (4): 1041–1050. DOI: 10.1007/s00280-013-2099-8.
29. Brana I., Calles A., Lo Russo P.M., Yee L.K., Puchalski T.A., Seetharam S., Zhong B., de Boer C.J., Tabernero J., Calvo E. Carlumab, an anti-C-C chemokine ligand 2 monoclonal antibody, in combination with four chemotherapy regimens for the treatment of patients with solid tumors: an open-label, multicenter phase 1b study. *Target Oncol.* 2015; 10 (1): 111–123. DOI: 10.1007/s11523-014-0320-2.
30. Bonapace L., Coissieux M.M., Wyckoff J., Mertz K.D., Varga Z., Junt T., Bentires-Alj M. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. *Nature.* 2014; 515 (7525): 130–133. DOI: 10.1038/nature13862.

31. Feng A.L., Zhu J.K., Sun J.T., Yang M.X., Neckenig M.R., Wang X.W., Shao Q.Q., Song B.F., Yang Q.F., Kong B.H., Qu X. CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 164 (1): 57–65. DOI:10.1111/j.1365-2249.2011.04321.
32. Jiang L., Jiang S., Situ D., Lin Y., Yang H., Li Y., Long H., Zhou Z.. Prognostic value of monocyte and neutrophils to lymphocytes ratio in patients with metastatic soft tissue sarcoma. *Oncotarget.* 2015; 6 (11): 9542–9550. DOI: 10.18632/oncotarget.3283.
33. Huang S.H., Waldron J.N., Milosevic M., Shen X., Ringash J., Su J., Tong L., Perez-Ordóñez B., Weinreb I., Bayley A.J., Kim J., Hope A., Cho B.C., Giuliani M., Razak A., Goldstein D., Shi W., Liu F.F., Xu W., O'Sullivan B. Prognostic value of pretreatment circulating neutrophils, monocytes, and lymphocytes in oropharyngeal cancer stratified by human papillomavirus status. *Cancer.* 2015; 121 (4): 545–555. DOI: 10.1002/cncr.29100.
34. Passlick B., Ziegler-Heitbrock L. Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human peripheral blood. *Blood.* 1989; 74 (7): 2527–2534.
35. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010; 116 (16): 74–80. DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558.
36. Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013; 496 (7446): 445–455. DOI: 10.1038/nature12034.
37. Fingerle G., Pforte A., Passlick B., Blumenstein M., Ströbel M., Ziegler-Heitbrock L. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes expanded in sepsis patients. *Blood.* 1993; 82 (10): 3170–3176.
38. Fingerle-Rowso G., Auers J., Kreuzer E., Fraunberger P., Blumenstein M., Ziegler-Heitbrock L. Expansion of CD14+CD16+ monocytes in critically ill cardiac surgery patients. *Inflammation.* 1998; 22 (8): 367–379. DOI: 10.1023/A:1022316815196.
39. Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol.* 2014; 289 (1–2): 135–139. DOI: 10.1016/j.cellimm.2014.03.019.
40. Gordon S. and Taylor P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5 (12): 953–964. DOI: 10.1038/nri1733.
41. Ginhoux F. and Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14 (6): 392–404. DOI: 10.1038/nri3671.
42. Cross J. Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity.* 2010; 33 (3): 375–386. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.08.012.
43. Zawada A.M., Rogacev K.S., Rotter B., Winter P., Marell R.R., Fliser D., Heine G.H. SuperSAGE evidence for CD14+CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood.* 2011; 118 (12): 50–61. DOI: 10.1182/blood-2011-01-326827.
44. Gratchev A., Ovsy I., Manousaridis I., Riabov V., Orekhov A., Kzhyshkowska J. Novel monocyte biomarkers of atherogenic conditions. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19 (33): 5859–5864. DOI: 10.2174/1381612811319330004.
45. Wong K.L., Tai J.J., Wong W.C., Han H., Sem X., Yeap W.H., Kourilsky P., Wong S.C. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 2011; 118 (5): 16–31. DOI: 10.1182/blood-2010-12-326355.
46. Saleh M.N., Goldman S.J., Lo Buglio A.F., Beall A.C., Sabio H., McCord M.C., Minasian L., Alpaugh R.K., Weiner L.M., Munn D.H. CD16 + monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 1995; 85 (10): 2910–2917.
47. Schauer D., Starlinger P., Reiter C., Jahn N., Zajc P., Buchberger E., Bachleitner-Hofmann T., Bergmann M., Stift A., Gruenberger T., Brostjan C. Intermediate monocytes but not TIE2- expressing monocytes are a sensitive diagnostic indicator for colorectal cancer. *PLoS One.* 2012; 7 (9): e44450. DOI: 10.1371/journal.pone.0044450.
48. Subimerb C., Pinlaor S., Lulitanond V., Khuntikeo N., Okada S., McGrath M.S., Wongkham S. Circulating CD14(+) CD16(+) monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma. *Clin. Exp. Immunol.* 2010; 161 (3): 471–479. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04200.
49. Hamm A., Prenen H., Van Delm W., Di Matteo M., Wenes M., Delamarre E., Schmidt T., Weitz J., Sarmiento R., Dezi A., Gasparini G., Rothé F., Schmitz R., D'Hoore A., Iserentant H., Hendlisz A., Mazzone M. Tumour-educated circulating monocytes are powerful candidate biomarkers for diagnosis and disease follow-up of colorectal cancer. *Gut.* 2016; 65 (6): 990–1000. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308988.
50. Grage-Griebenow E., Zawatzky R., Kahlert H., Brade L., Flad H., Ernst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64+/CD16+ blood monocytes. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31 (1): 48–56. DOI: 10.1002/1521-4141(200101)31:1<48::AID-IMMU48>3.0.CO;2-5
51. Turrini R., Pabois A., Xenarios I., Coukos G., Delaloye J.F., Doucey M.A. TIE-2 expressing monocytes in human cancers. *Oncoimmunology.* 2017; 6 (4): e1303585. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1303585.
52. Welford A.F., Bizziato D., Coffelt S.B., Nucera S., Fisher M., Pucci F., Di Serio C., Naldini L., De Palma M., Tozer G.M., Lewis C.E. TIE2-expressing macrophages limit the therapeutic efficacy of the vascular disrupting agent combretastatin A4 phosphate in mice. *J. Clin. Invest.* 2011; 121 (5): 1969–1973. DOI: 10.1172/JCI44562.
53. Guex N., Crespo I., Bron S., Ifticene-Treboux A., Faes-Van't Hull E., Kharoubi S., Liechti R., Werffeli P., Ib-

- berson M., Majo F., Nicolas M., Laurent J., Garg A., Zaman K., Lehr H.A., Stevenson B.J., Rüegg C., Coukos G., Delaloye J.F., Xenarios I., Doucey M.A. Angiogenic activity of breast cancer patients' monocytes reverted by combined use of systems modeling and experimental approaches. *PLoS Comput Biol.* 2015; Mar. 13; 11 (3): e1004050. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004050.
54. Forget M.A., Voorhees J.L., Cole S.L., Dakhallah D., Patterson I.L., Gross A.C., Moldovan L., Mo X., Evans R., Marsh C.B. Macrophage colony-stimulating factor augments Tie2-expressing monocyte differentiation, angiogenic function, and recruitment in a mouse model of breast cancer. *PLoS One.* 2014; 9 (6): e98623. DOI: 10.1371/journal.pone.0098623.
 55. Ibberson M., Bron S., Guex N., Faes-van't Hull E., Ifticene-Treboux A., Henry L., Lehr H.A., Delaloye J.F., Coukos G., Xenarios I. TIE-2 and VEGFR kinase activities drive immunosuppressive function of TIE-2-expressing monocytes in human breast tumors. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19 (13): 3439–3449. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3181.
 56. Pulaski H.L., Spahlinger G., Silva I.A., McLean K., Kueck A.S., Reynolds R.K., Coukos G., Conejo-Garcia J.R., Buckanovich R.J. Identifying alemtuzumab as an anti-myeloid cell antiangiogenic therapy for the treatment of ovarian cancer. *J. Transl. Med.* 2009; Jun. 19; 7 (1): 49. DOI: 10.1186/1479-5876-7-49.
 57. Bron S., Henry L., Faes-van't Hull E., Turrini R., Vanhecke D., Guex N., Ifticene-Treboux A., Iancu E.M., Semilietof A., Rufer N., Lehr H.-A., Xenarios I., Coukos G., Delaloye J.F., Doucey M.A. TIE-2-expressing monocytes are lymphangiogenic and associate specifically with lymphatics of human breast cancer. *Oncoimmunology.* 2016; 5 (2): e1073882. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1073882.
 58. Tsutsui S., Inoue H., Yasuda K., Suzuki K., Takeuchi H., Nishizaki T., Higashi H., Era S., Mori M. Angiopoietin-2 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: its relationship to the VEGF expression and microvessel density. *Breast Cancer Res. Treat.* 2006; 98 (3): 261–266. DOI: 10.1007/s10549-005-9157-9.
 59. Ji J., Zhang G., Sun B., Yuan H., Huang Y., Zhang J., Wei X., Zhang X., Hou J. The frequency of tumor-infiltrating Tie-2-expressing monocytes in renal cell carcinoma: its relationship to angiogenesis and progression. *Urology.* 2013; 82 (4): e9–13. DOI: 10.1016/j.urology.2013.05.026.
 60. Schauer D., Starlinger P., Reiter C., Jahn N., Zajc P., Buchberger E., Bachleitner-Hofmann T., Bergmann M., Stift A., Gruenberger T., Brostjan C. Intermediate Monocytes but Not TIE2-Expressing Monocytes Are a Sensitive Diagnostic Indicator for Colorectal Cancer. *PLoS One.* 2012; 7 (9): e44450. DOI: 10.1371/journal.pone.0044450.
 61. Gabrusiewicz K., Liu D., Cortes-Santiago N., Hossain M.B., Conrad C.A., Aldape K.D., Fuller G.N., Marini F.C., Alonso M.M., Idoate M.A., Gilbert M.R., Fueyo J., Gomez-Manzano C. Anti-vascular endothelial growth factor therapy-induced glioma invasion is associated with accumulation of Tie2-expressing monocytes. *Oncotarget.* 2014; 5 (8): 2208–2220. DOI: 10.18632/oncotarget.1893.
 62. Venneri M.A., De Palma M., Ponzoni M., Pucci F., Scielzo C., Zonari E., Mazzeri R., Doglioni C., Naldini L. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood.* 2007; 109 (12): 5276–5285. DOI: 10.1182/blood-2006-10-053504.
 63. Goede V., Coutelle O., Shimabukuro-Vornhagen A., Holtick U., Neuneier J., Koslowsky T.C., Weihrauch M.R., von Bergwelt-Baildon M., Hacker U.T. Analysis of Tie2-expressing monocytes (TEM) in patients with colorectal cancer. *Cancer Invest.* 2012; 30 (3): 225–230. DOI: 10.3109/07357907.2011.636114.
 64. De Palma M., Murdoch C., Venneri M.A., Naldini L., Lewis C.E. Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol.* 2007; 28 (12): 519–524. DOI: 10.1016/j.it.2007.09.004.
 65. Sainz B.J., Carron E., Vallespinys M., Machado H.L. Cancer stem cells and macrophages: implications in tumor biology and therapeutic strategies. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016: 1–15. DOI: 10.1155/2016/9012369.
 66. Gasteiger G., D'Osualdo A., Schubert D.A., Weber A., Bruscia E.M., Hartl D. Cellular Innate Immunity: An old game with new players. *J. Innate Immun.* 2017; 9 (2): 111–125. DOI: 10.1159/000453397.
 67. Saeed S., Quintin J., Kerstens H.H., Rao N.A., Aghajani-refah A., Matarese F., Cheng S.C., Ratter J., Berentsen K., van der Ent M.A., Sharifi N., Janssen-Megens E.M., Ter Huurne M., Mandoli A., van Schaik T., Ng A., Burden F., Downes K., Frontini M., Kumar V., Giamarellos-Bourboulis E.J., Ouwehand W.H., van der Meer J.W., Joosten L.A., Wijmenga C., Martens J.H., Xavier R.J., Logie C., Netea M.G., Stunnenberg H.G. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science.* 2014; 345 (6204): 1251086. DOI: 10.1126/science.1251086.
 68. Hoeksema M.A., de Winther M.P. Epigenetic regulation of monocyte and macrophage function. *Antioxid Redox Signal.* 2016; 25 (14): 758–774. DOI: 10.1089/ars.2016.6695.
 69. Netea M.G., Joosten L.A., Latz E., Mills K.H., Natoli G., Stunnenberg H.G., O'Neill L.A., Xavier R.J. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 2016; 352 (6284): aaf1098. DOI: 10.1126/science.aaf1098.
 70. Bekkering S., Joosten L.A., van der Meer J.W., Netea M.G., Riksen N.P. The epigenetic memory of monocytes and macrophages as a novel drug target in atherosclerosis. *Clin. Ther.* 2015; 37 (4): 914–923. DOI: 10.1016/j.clinthera.2015.01.008.
 71. van Diepen J.A., Thiem K., Stienstra R., Riksen N.P., Tack C.J., Netea M.G. Diabetes propels the risk for cardiovascular disease: sweet monocytes becoming aggres-

- sive? *Cell Mol. Life Sci.* 2016; 73 (24): 4675–4684. DOI: 10.1007/s00018-016-2316-9.
72. Almatroodi S.A., McDonald C.F., Collins A.L., Darby I.A., Pouniotis D.S. Blood classical monocytes phenotype is not altered in primary non-small cell lung cancer. *World J. Clin. Oncol.* 2014; 5 (5): 1078–1087. DOI: 10.5306/wjco.v5.i5.1078.
 73. Hanna R.N., Cekic C., Sag D., Tacke R., Thomas G.D., Nowyhed H., Herrley E., Rasquinha N., McArdle S., Wu R., Peluso E., Metzger D., Ichinose H., Shaked I., Chodaczek G., Biswas S.K., Hedrick C.C. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science.* 2015; 350 (6263): 985–990. DOI: 10.1126/science.aac9407.
 74. Zhang B., Cao M., He Y., Liu Y., Zhang G., Yang C., Du Y., Xu J., Hu J., Gao F. Increased circulating M2-like monocytes in patients with breast cancer. *Tumour Biol.* 2017; 39 (6): 1010428317711571. DOI: 10.1177/1010428317711571.
 75. Adams D.L., Martin S.S., Alpaugh R.K., Charpentier M., Tsai S., Bergan R.C., Ogden I.M., Catalona W., Chumsri S., Tang C.M., Cristofanilli M. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014; 111 (9): 3514–3519. DOI: 10.1073/pnas.1320198111.
 76. Adams D.L., Adams D.K., Alpaugh R.K., Cristofanilli M., Martin S.S., Chumsri S., Tang C.M., Marks J.R. Circulating cancer-associated macrophage-like cells differentiate malignant breast cancer and benign breast conditions. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2016; 25 (7): 1037–1042. DOI: 10.1158/1055-9965.
 77. Biswas S.K., Mantovani A. Macrophages: biology and role in the pathology of diseases. New York: Springer, 2014: 7–11. DOI: 10.1007/978-1-4939-1311-4.
 78. Zhao L., Shao Q., Zhang Y., Zhang L., He Y., Wang L., Kong B., Qu X. Human monocytes undergo functional re-programming during differentiation to dendritic cell mediated by human extravillous trophoblasts. *Sci. Rep.* 2016; 6 (1): 20409. DOI: 10.1038/srep20409.
 79. Baj-Krzyworzeka M., Baran J., Szatanek R., Mytar B., Siedlar M., Zembala M. Interactions of human monocytes with TMVs (tumour-derived microvesicles). *Biochem. Soc. Trans.* 2013; 41 (1): 268–272. DOI: 10.1042/BST20120244.
 80. Dimitrov S., Shaikh F., Pruitt C., Green M., Wilson K., Beg N., Hong S. Differential TNF production by monocyte subsets under physical stress: blunted mobilization of proinflammatory monocytes in prehypertensive individuals. *Brain Behav. Immun.* 2013; 27 (1): 101–108. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.10.003.
 81. van Furth R., Cohn Z.A., Hirsch J.G., Humphrey J.H., Spector W.G., Langevoort H.L. Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line. *Bull World Health Organ.* 1972; 47: 651–658.
 82. Guillelliams M., van de Laar L.. A hitchhiker's guide to myeloid cell subsets: practical implementation of a novel mononuclear phagocyte classification system. *Front. Immunol.* 2015; 6. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00406.
 83. Чердынцева Н.В., Митрофанова И.В., Булдаков М.А., Стахеева М.Н., Патышева М.Р., Завьялова М.В., Кжышкова Ю.Г. Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии. *юл-летень сибирской медицины.* 2017; 16 (4): 61–74. [Cherdyntseva N.V., Mitrofanova I.V., Buldakov M.A., Stakheeva M.N., Patysheva M.R., Zavjalova M.V., Kzhyshkowska J.G. Macrophages and tumor progression: on the way to macrophage-specific therapy. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017; 16 (4): 61–74 (in Russ.)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-61-74.
 84. Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013; 496 (7446): 445–455. DOI: 10.1038/nature12034.
 85. Movahedi K., Laoui D., Gysemans C., Baeten M., Stangé G., Van den Bossche J., Mack M., Pipeleers D., In't Veld P., e Baetselier P. Van Ginderachter J.A. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res.* 2010; 70 (14): 5728–5739. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4672.
 86. Franklin R.A., Liao W., Sarkar A., Kim M.V., Bivona M.R., Liu K., Pamer E.G., Li M.O. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science.* 2014; 344 (6186): 921–925. DOI: 10.1126/science.1252510.
 87. Qian B.Z., Li J., Zhang H., Kitamura T., Zhang J., Campion L.R., Kaiser E.A., Snyder L.A., Pollard J.W. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.* 2011; 475 (7355): 222–225. DOI: 10.1038/nature10138.
 88. Shand F.H., Ueha S., Otsuji M., Koid S.S., Shichino S., Tsukui T., Kosugi-Kanaya M., Abe J., Tomura M., Zio-gas J., Matsushima K. Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014; 111 (21): 7771–7776. DOI: 10.1073/pnas.1402914111.
 89. Harney A.S., Arwert E.N., Entenberg D., Wang Y., Guo P., Qian B.Z., Oktay M.H., Pollard J.W., Jones J.G., Condeelis J.S. Real-time imaging reveals local, transient vascular permeability, and tumor cell intravasation stimulated by TIE2hi macrophage-derived VEGFA. *Cancer Discov.* 2015; 5 (9): 932–943. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0012.
 90. Sawanobori Y., Ueha S., Kurachi M., Shimaoka T., Talmadge J.E., Abe J., Shono Y., Kitabatake M., Kakimi K., Mukaida N., Matsushima K. Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood.* 2008; 111 (12): 5457–5466. DOI: 10.1182/blood-2008-01-136895.
 91. Bögers M., Braster R., Nijland P.G., Gül N., van de Luijtgaaarden W., Fijneman R.J., Meijer G.A., Jimenez C.R., Beelen R.H., van Egmond M. Carcinoma origin dictates differential skewing of monocyte function. *OncoImmunology.* 2012; 1 (6): 798–809. DOI: 10.4161/onci.20427.

92. Baron S., Finbloom J., Horowitz J., Bekisz J., Morrow A., Zhao T., Fey S., Schmeisser H., Balinsky C., Miyake K., Clark C., Zoon K. Near eradication of clinically relevant concentrations of human tumor cells by interferon-activated monocytes in vitro. *J. Interferon. Cytokine Res.* 2011; 31 (7): 569–573. DOI: 10.1089/jir.2010.0153.
93. Кжышковска Ю.Г., Митрофанова И.В., Завьялова М.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Опухолеассоциированные макрофаги. М.: Наука, 2017: 224. [Kzhyshkowska J.G., Mitrofanova I.V., Zavyalova M.V., Slonimskaya E.M., Cherdynitseva N.V. Tumor-associated macrophages. Moscow: Nauka Publ., 2017: 224 (in Russ)].
94. Hettinger J., Richards D.M., Hansson J., Barra M.M., Joschko A.C., Krijgsvelde J., Feuerer M. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* 2013; 14 (8): 821–830. DOI: 10.1038/ni.2638.
95. Segura E., Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends immunol.* 2013; 34 (9): 440–445. DOI: 10.1016/j.it.2013.06.001.
96. Maeng H., Terabe M., Berzofsky J.A. Cancer vaccines: translation from mice to human clinical trials. *Curr. Opin Immunol.* 2018; 51: 111–122. DOI: 10.1016/j.coi.2018.03.001.
97. Kongsted P., Borch T.H., Ellebaek E., Iversen T.Z., Andersen R., Met Ö., Hansen M., Lindberg H., Sengeløv L., Svane I.M. Dendritic cell vaccination in combination with docetaxel for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: A randomized phase II study. *Cytotherapy.* 2017; 19 (4): 500–513. DOI: 10.1016/j.jcyt.2017.01.007.
98. Vuk-Pavlović S., Bulur P.A., Lin Y., Qin R., Szumlanski C.L., Zhao X., Dietz A.B. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/-monocytes in prostate cancer. *Prostate.* 2010; 70 (4): 443–455. DOI: 10.1002/pros.21078.
99. Laborde R.R., Lin Y., Gustafson M.P., Bulur P.A., Dietz A.B. Cancer vaccines in the world of immune suppressive monocytes (CD14+HLA-DRlow/neg cells): the gateway to improved responses. *Frontiers in Immunology.* 2014; 5: 147. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00147.
100. Yu J., Du W., Yan F., Wang Y., Li H., Cao S., Yu W., Shen C., Liu J., Ren X. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol.* 2013; 190 (7): 3783–3797. DOI:10.4049/jimmunol.1201449.
101. Mougiakakos D., Jitschin R., von Bahr L., Poschke I., Gary R., Sundberg B., Gerbitz A., Ljungman P., Le Blanc K. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/neg IDO+ myeloid cells in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2013; 27 (2): 377–388. DOI: 10.1038/leu.2012.215.
102. Maeda A., Kawamura T., Ueno T., Usui N., Miyagawa S. Monocytic suppressor cells derived from human peripheral blood suppress xenogenic immune reactions. *Xenotransplantation.* 2014; 21 (1): 46–56. DOI: 10.1111/xen.12067.
103. Poschke I., Mao Y., Adamson L., Salazar-Onfray F., Masucci G., Kiessling R. Myeloid-derived suppressor cells impair the quality of dendritic cell vaccines. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012; 61 (6): 827–838. DOI: 10.1007/s00262-011-1143-y.
104. Gustafson M.P., Lin Y., New K.C., Bulur P.A., O'Neill B.P., Gastineau D.A., Dietz A.B. Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DRlow/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone. *Neuro Oncol.* 2010; 12 (7): 631–644. DOI:10.1093/neuonc/noq001.
105. Engblom C., Pfirschke C., Pittet M.J. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer.* 2016; 16 (7): 447–462. DOI: 10.1038/nrc.2016.54.
106. Bonapace L., Coissieux M.M., Wyckoff J., Mertz K.D., Varga Z., Junt T., Bentires-Alj M. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. *Nature.* 2014; 515 (7525): 130–133. DOI: 10.1038/nature13862.
107. Germano G., Frapolli R., Belgiovine C., Anselmo A., Pesce S., Liguori M., Erba E., Ubaldi S., Zucchetti M., Pasqualini F. Role of macrophage targeting in the anti-tumor activity of trabectedin. *Cancer Cell.* 2013; 23 (2): 249–262. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.01.008.

Сведения об авторах

Патышева Марина Ринатовна, врач-лаборант, лаборатория молекулярной онкологии и иммунологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-2865-7576.

Стахеева Марина Николаевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория молекулярной онкологии и иммунологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; ст. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ; ст. науч. сотрудник, НИ ТПУ, г. Томск.

Ларионова Ирина Валерьевна, мл. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекуляр-

Authors information

Patysheva Marina R., Junior Researcher, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2865-7576.

Stakheeva Marina N., DM, Senior Researcher, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Larionova Irina V., Junior Researcher, Laboratory of Translational Cellular and Molecular Biomedicine, NR TSU, Post-Graduate Student, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5758-7330.

ной биомедицины, НИ ТГУ; аспирант, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-5758-7330.

Тарабановская Наталья Анатольевна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, отделение общей онкологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-1630-4466.

Григорьева Евгения Сергеевна, канд. мед. наук, мл. науч. сотрудник, лаборатория молекулярной онкологии и иммунологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; ст. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-4671-6306.

Слонимская Елена Михайловна, д-р мед. наук, профессор кафедры общей онкологии, СибГМУ; зав. отделением общей онкологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-4382-5697.

Кжышкowska Юлия Георгиевна, д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ; зав. отделом врожденного иммунитета и толерантности, Институт трансфузионной медицины и иммунологии, Университет Гейдельберга, г. Маннхайм. ORCID iD 0000-0003-0898-3075.

Чердынцева Надежда Викторовна, д-р биол. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; вед. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-1526-9013.

(✉) **Патышева Марина Ринатовна**, e-mail: starin5@yandex.ru.

Tarabanovskaya Natalia A., PhD, Researcher, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1630-4466.

Grigorieva Evgenia S., PhD, Junior Researcher, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, RAS; Researcher, Laboratory of Translational Cellular and Molecular Biomedicine, NR TSU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-4671-6306.

Slonimskaya Elena M., DM, Professor, Head of the General Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-4382-5697.

Kzhyshkowska Julia G., DBS, Professor, Head of the Laboratory Translational Cellular and Molecular Biomedicine, NR TSU, Tomsk, Russian Federation; The Head of the Department of Innate Immunity and Tolerance, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany. ORCID iD 0000-0003-0898-3075.

Cherdyntseva Nadezhda V., DBS, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, RAS; Senior Researcher, Laboratory of Translational Cellular and Molecular Biomedicine, NR TSU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1526-9013.

(✉) **Patysheva Marina R.**, e-mail: starin5@yandex.ru.

Received 15.08.2018

Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 15.08.2018

Подписана в печать 17.12.2018

УДК 616-056.43:577.25

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-76-83>

Аллерген-ассоциированные молекулярные паттерны: новое слово в современной аллергологии

Свиридова В.С., Исаев П.Ю., Климов В.В., Романова М.И., Кошкарлова Н.С.

Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

В последнее десятилетие ни у кого не вызывает сомнения факт важности вовлечения в формирование адаптивного иммунного ответа компонентов врожденной иммунной системы. Основным триггером, вызывающим активацию врожденного иммунитета, являются молекулярные паттерны. В статье рассмотрены вопросы, касающиеся роли паттернов в механизмах иммунитета, а также освещены новые данные об аллерген-ассоциированных молекулярных паттернах.

Ключевые слова: аллерген-ассоциированные молекулярные паттерны, врожденный иммунитет, иммуноглобулин E (IgE), В-клеточный рецептор (BCR).

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при написании статьи.

Для цитирования: Свиридова В.С., Исаев П.Ю., Климов В.В., Романова М.И., Кошкарлова Н.С. Аллерген-ассоциированные молекулярные паттерны: новое слово в современной аллергологии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 76–83. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-76-83>.

УДК 616-056.43:577.25

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-76-83>

Allergen-associated molecular patterns: a new trend in modern allergology

Sviridova V.S., Isaev P.Yu., Klimov V.V., Romanova M.I., Koshkarova N.S.

Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Over the last decade the role of innate immunity has been known to be crucial for the activation of adaptive immune system. The main triggers that upregulate reactions of innate immunity are small exogenous molecules with conserved motifs, molecular patterns. The article discusses a variety of possible

✉ Свиридова Валентина Сергеевна, e-mail: VSSviridova@mail.ru.

roles of molecular patterns in the immune mechanisms, including the participation of Allergen Associated Molecular Patterns (AAMPs) in allergic processes.

Key words: allergen-associated molecular patterns, innate immunity, immunoglobulin E (IgE), B-cell receptor (BCR).

Conflict of interest. The authors declare no possible or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that no funding has been received for the study.

For citation: Sviridova V.S., Isaev P.Yu., Klimov V.V., Romanova M.I., Koshkarova N.S. Allergen-associated molecular patterns: a new trend in modern allergology. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 76–83. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-76-83](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-76-83).

ВВЕДЕНИЕ

Прошло относительно немного по историческим меркам времени с тех пор, как для иммунологов термин «паттерны» стал привычной и неотъемлемой частью понимания того, как происходит активация иммунной системы в ответ на проникновение антигена. Современная иммунология, по словам одного из известнейших исследователей, базируется на двух парадигмах: классической – клонально-селекционной теории, и новой – теории распознавания паттернов, которые были сформулированы теоретически и нашли свое подтверждение на практике [1].

Первопроходцем в понимании того, как запускается доиммунное воспаление в том виде, как мы представляем себе это сейчас, был Charles A. Jeneway Jr. Вплоть до 1989 г. иммунологи полагали, что адаптивный иммунитет способен распознать и уничтожить любой антиген. Для этого нужно только вызвать активацию лимфоцитов. Вызвать же активацию лимфоцитов случайным антигеном можно при соблюдении ряда условий, например при особом воздействии антигена клетки адаптивного иммунитета [1, 2], в частности при добавлении адъюванта. Jeneway показал, почему адаптивному иммунитету требуется дополнительный сигнал в виде адъювантов. Дополнительная дифференцировка Т- и В-лимфоцитов в ходе иммунного ответа должна опираться на отдельную систему клеток и рецепторов, поскольку антигенраспознающие рецепторы самих Т- и В-клеток формируются в результате генетической рекомбинации случайным образом. Именно это позволяет лимфоцитам в ходе адаптивных ответов отвечать на те антигены, с которыми они не сталкивались ранее. Однако это означает и то, что лимфоциты могут формировать аутореактив-

ные рецепторы. Таким образом, Jeneway сформулировал проблему, представлявшуюся на тот момент революционной: как лимфоциты узнают, когда нужно пролиферировать и атаковать, а когда – нет, если единственным источником информации является антиген [2].

Идея о том, что лимфоцитам требуется «второй сигнал» для активации, была выдвинута еще в середине 1970-х, когда была показана различная роль антигенного и поликлонального (под влиянием липополисахаридов) сигнала в процессе активации В-клеток. В дальнейшем стало понятно, что в процессе клональной делеции в центральных органах иммунитета все аутореактивные клоны лимфоцитов не элиминируются и, следовательно, должны существовать механизмы поддержания толерантности на периферическом уровне. Все это не согласовалось с классической клонально-селекционной теорией [1]. Jeneway предположил, что адаптивный иммунитет опирается на рецепторы, которые генерируются не случайно, а отбираются эволюционно [2].

К тому моменту в ходе ряда исследований было показано, что одного лишь распознавания антигена недостаточно для того, чтобы вызвать активацию лимфоцитов. Стало ясно, что антигенпрезентирующие клетки выполняют какую-то дополнительную, акцессорную, функцию, необходимую для активации Т-клетки. Наличие этого дополнительного «второго сигнала» – чрезвычайно важный аспект активации лимфоцитов [2].

В 1989 г. Jeneway выступил со своей теорией, в которой показал, как важнейшие исследования К. Ландштейнера, демонстрировавшие, что химически модифицированный белок может вызвать формирование антител, привели к глобальному заблуждению о том, что любая «чужеродная ма-

кромолекула способна активировать иммунный ответ». Jеneway заявил, что иммунная система не только дифференцирует «свое» и «не свое», но также разделяет «неинфекционное свое» от «инфекционного чужого». Таким способом иммунная система реагирует именно на присутствие микроорганизмов. Он предположил, что врожденный иммунитет выполняет эту функцию разделения благодаря наличию инвариантных генетически запрограммированных рецепторов, способных распознать микробные молекулярные паттерны с консервативным мотивом [1, 2].

Таким образом, разные формы иммунного распознавания, присущие врожденному и адаптивному иммунитету, играют фундаментально различную роль в функционировании иммунной системы [1]. Предложенная теория распознавания паттернов дополнила клонально-селекционную теорию: лимфоциты активируются антигеном только тогда, когда получают от врожденного иммунитета сигнал, подтверждающий микробный характер антигена. Сейчас эти положения представляются фундаментальными. Тем более интересным представляется тот факт, что в течение почти 7 лет эта теория игнорировалась и практически не цитировалась в публикациях [1].

Первоначально речь шла только лишь о так называемых патоген-ассоциированных молекулярных паттернах (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). В настоящее время выделяют и другие виды молекулярных паттернов: паттерны, ассоциированные с клеточным стрессом (damage-associated molecular patterns, DAMPs), паттерны, ассоциированные с опухолевой трансформацией (tumor-associated molecular patterns, TAMPs), и аллерген-ассоциированные молекулярные паттерны (allergen-associated molecular patterns, AAMPs).

СТРУКТУРА РЕЦЕПТОРОВ К IgE И BCR

В докладе World Allergy Organization, опубликованном в 2014 г., сообщается, что около 30% населения страдает аллергическими атопическими заболеваниями, такими как астма и пищевая аллергия [3]. Проблему представляют не только сами эти болезни, но и то, что развитие атопической патологии у пациента приводит к изменению реактивности его иммунной системы в плане ответа на инфекционные и другие виды антигенов [4, 5]. Это влечет за собой увеличение экономических расходов как для самого больного, так и для общества в целом. На фоне роста заболеваемости атопическими аллергиче-

скими заболеваниями, которые из достаточно редких эпизодов в прошлом приобрели в настоящее время характер пандемии [6], очевидно, что дальнейшее изучение патогенеза атопии с возможностью разработки новых терапевтических подходов имеет большие перспективы.

Ведущую роль в патогенезе атопии играет продукция аллерген-специфических антител, иммуноглобулинов (Ig) E, которые при взаимодействии с комплементарным рецептором 1-го типа на клетке (FcεR I) и аллергеном являются необходимыми элементами для выделения клеткой-мишенью биологически активных веществ, обуславливающих развитие клинических проявлений атопического заболевания.

FcεR I – высокоаффинный рецептор IgE, представляет собой молекулу, которая может существовать на поверхности клетки как в виде тетрамера (включающего цепи α, β и две γ), так и тримера, в состав которого входят лишь α-цепь и гомодимер, состоящий из двух γ-цепей [7, 8]. Альфа-цепь представляет собой молекулу, имеющую во внеклеточной части два иммуноглобулиноподобных домена, способных взаимодействовать с молекулой IgE, трансмембранную часть и короткий цитоплазматический хвост. Именно эта цепь рецептора взаимодействует с лигандом – Fc-фрагментом мономерной молекулы IgE. Напротив, β- и γ-цепи не принимают участия в связывании лиганда, но имеют в своем цитоплазматическом участке активационную последовательность ITAM. В то время как β-цепь способна амплифицировать экспрессию FcεR I на тучных клетках и базофилах и правильную конформацию рецептора, γ-цепи являются необходимым компонентом рецептора для проведения сигнала внутрь клетки. FcεR I в виде тетрамера экспрессируется на тучных клетках и базофилах. Связывание антигена с этим рецептором приводит к дегрануляции клетки с выделением медиаторов воспаления. FcεR I в виде тримера экспрессируется на мембране антигенпрезентирующих клеток, эозинофилов, базофилов и тучных клеток. Связывание этого рецептора с антигеном приводит к интернализации рецептора, процессингу и презентации антигена в комплексе с молекулами HLA класса II [7, 8].

Помимо «полноразмерной» β-цепи в клетках может экспрессироваться так называемый усеченный вариант этой молекулы βT. Такая цепь, будучи включенной в состав рецептора, конкурирует с нормальной β-цепью и снижает экспрессию FcεR I на поверхности клетки. На базофи-

лах рецепторы с нормальной и усеченной цепью экспрессируются в разной пропорции, благодаря этому регулируется экспрессия рецептора на клетке. Это влияет на развитие аллергических заболеваний, поскольку показано, что атопический статус пациента коррелирует с уровнем экспрессии FcεR I на тучных клетках, базофилах, моноцитах и дендритных клетках [8].

На сегодняшний день описана структура В-клеточного рецептора для распознавания антигена BCR как молекулярного комплекса, центральное место в котором занимает мономерная молекула иммуноглобулина, интегрированная в клеточную мембрану. Известно, что на поверхности зрелого В-лимфоцита содержатся BCR, в состав которых входят IgM и IgD. Молекула иммуноглобулина коэкспрессирована с рецепторами Igα и Igβ. На плазматической мембране покоящегося В-лимфоцита экспрессировано несколько десятков тысяч BCR. При этом, как известно, каждый рецептор имеет два идентичных активных центра для связывания с антигеном [9, 10]. В-клетки, принимающие участие в иммунном ответе в ходе атопической аллергической реакции в качестве мембранной молекулы иммуноглобулина, несут IgE.

Для переключения изотипа антител, синтезируемых В-клеткой и входящих в состав BCR, необходимы дополнительные костимулирующие сигналы: достаточные концентрации интерлейкина (IL) 4, 13 в микроокружении лимфоцита, а также взаимодействие CD40L на Th2 и CD40 на В-клетке. Существует мнение, что в процессе переключения изотипов с IgM на IgE существует промежуточная стадия переключения на IgG, необходимая для созревания аффинности антител в ходе IgE-зависимого ответа. В результате прямого переключения μ-цепи на ε-цепь формируются низкоаффинные антитела [11, 12]. Такие антитела будут вступать в конкурентные взаимоотношения с высокоаффинными IgE, ослабляя тем самым IgE-зависимую активацию тучных клеток и базофилов [11].

МОДЕЛИ АКТИВАЦИИ В-ЛИМФОЦИТА

Существует несколько моделей активации В-лимфоцита [12]. Первая модель предполагает, что связывание антигена приводит к изменениям прилежащего к мембране домена молекулы иммуноглобулина и подготавливает цитоплазматический домен к проведению сигнала. Вторая модель была предложена на основе наблюдений о том, что в отсутствии антигенного сигнала ряд веществ способен вызвать деполимеризацию ак-

тина, что приводит к генерации сигнала через В-клеточный рецептор.

Наконец, третья модель предполагает, что на покоящихся В-клетках BCR находится в состоянии олигомеризации, подавляющей собственную активность. Под влиянием антигена происходит диссоциация таких олигомеров, сопровождающаяся восстановлением способности BCR к проведению сигнала внутрь клетки [10].

Согласно классическим представлениям, для активации В-клетки необходима поперечная сшивка, по крайней мере, двух молекул BCR. Известно, что IgM-BCR могут быть активированы антигенами с низкой валентностью, в то время как IgD-BCR воспринимают сигнал только от поливалентных антигенов. Поскольку IgD-BCR отсутствуют на незрелых В-клетках и появляются на них в процессе созревания, на зрелых фолликулярных В-лимфоцитах, вероятно, это приводит к «переключению» чувствительности В2 лимфоцитов в пользу поливалентных антигенов. Таким способом вызвать активацию В-клетки могут антигены с повторяющимися одинаковыми эпитопами или антигены, способные формировать гомо-олигомеры. Повышение валентности антигена приводит к усилению ответа В-клеток на стимуляцию [12]. Однако слишком большое расстояние между эпитопами антигена приводит к неответственности В-клеток. Итак, для того, чтобы вызвать продуктивную активацию лимфоцита, необходимо соблюдение следующих условий: достаточная плотность эпитопов, оптимальное расстояние между ними и достаточная ригидность структуры антигена. В опытах на мышах было показано, что растворимые мономерные антигены не вызывали активации В-лимфоцитов [12]. То же самое относится и к активации клеток-мишеней при атопической аллергической реакции, сопровождающейся выбросом медиаторов воспаления. Было показано, что для продуктивной активации тучных клеток и базофилов необходима поперечная сшивка антигеном молекул IgE, фиксированных на комплементарных FcεR на клетках-мишенях. Только в этом случае наблюдается кластеризация рецепторов, сопровождающаяся активацией прилежащей клеточной мембраны и выбросом медиаторов воспаления [8].

Таким образом, антигены, способные к олигомеризации, формированию агрегатов или имеющие в своем составе повторяющиеся эпитопы, являются потенциально способными вызывать аллергические реакции [12]. Так возникла новая концепция о существовании аллерген-ассоциированных молекулярных паттернов.

КОНЦЕПЦИЯ ААМР₅

Эти молекулы характеризуются определенными качествами и могут быть обнаружены у различных аллергенов, вызывающих развитие atopических аллергических реакций, в том числе перекрестных (пыльцевые, пищевые, инсектные, бытовые и др.) [5]. С одной стороны, показано, что мономерные антигены или антигены с малой плотностью эпитопов никогда не индуцируют толерантность в отличие от антигенов с высокой плотностью антигенных детерминант [13]. С другой стороны, отмечено, что антигены с низкой плотностью детерминант также не могут вызывать и активацию В-лимфоцитов. Таким образом, антигену для активации В-клетки нужно иметь некоторое число (12–20) эпитопов, расположенных на определенном расстоянии и связанных с достаточной степенью ригидности. Взаимодействие же двух эпитопов в молекуле антигена с одной молекулой IgE в составе В-клеточного рецептора или в связи с комплементарным рецептором на клетке приводит не к активации, а, напротив, к развитию ареактивности лимфоцита и формированию толерантности [13].

В экспериментах продемонстрировано, что связывание моновалентных антигенов или бивалентного антигена с коротким расстоянием между эпитопами, взаимодействующими с одним В-клеточным рецептором, приводит к увеличению срока жизни клетки и продукции цитокинов, но не к антителообразованию. Кроме того, сигнал от эпитопа должен поддерживаться сигналами от молекул CD21 и TLR4. Иными словами, В-клетки являются паттерн-распознающими клетками, которые активируются не только при взаимодействии с антигенной детерминантой, но и в результате определенной пространственной структуры антигенов с повторяющимися эпитопами [13]. Экспрессия повторяющихся эпитопов в молекуле антигена необходима для формирования В-клеток памяти, их реактивации и экспансии [13].

Схожие результаты были получены и в исследованиях, освещающих взаимодействие аллергенов с дендритными клетками. Авторами [5] отмечено, что под влиянием стимуляции аллергеном дендритные клетки начинают продуцировать фактор некроза опухоли альфа (TNF α), являющегося одним из маркеров ранней активации. Хорошо известно, что дендритные клетки не только выполняют функцию антигенной презентации, но и регулируют врожденный иммунный ответ и воспаление. Кроме того, ранее было по-

казано, что мажорный аллерген арахиса Ara h 1 способен к сдвигу иммунорегуляции в сторону Е-хелперов 2-го типа благодаря взаимодействию с лектиновым рецептором DC-SIGN на дендритных клетках.

Известен факт, что мажорный аллерген домашней пыли Der p 1 способен проявлять протеазную активность и взаимодействовать с рецептором protease-activated receptor 2 (PAR-2) [5]. Поскольку существует взаимная регуляция активности лектиновых рецепторов и TLR [5], данные о том, что аллергены домашней пыли способны взаимодействовать с DC-SIGN, L-SIGN и другими лектиновыми рецепторами, дают основание полагать, что поперечная сшивка рецепторов PAR-2 и лектиновых рецепторов приводит к усилению активационного сигнала в В-клетках [5].

Расстояние между эпитопами играет важную роль не только в активации В-лимфоцита и формировании сенсibilизации к аллергену, но и в эффекторной фазе немедленной аллергической реакции, когда IgE связывается с высокоаффинным рецептором на клетках-мишенях. Аллерген должен быть, по крайней мере, бивалентным. Более того, сила сигнала зависит и от концентрации и аффинности связи антигена с рецептором, и от расстояния между эпитопами в молекуле антигена [12, 13].

Показано, что в процессе взаимодействия с антигеном молекулы IgE, связанные с рецептором на клетке, могут сближаться благодаря латеральной диффузии рафтов в мембране. Даже относительно короткие бивалентные антигены могут вызывать активацию мембраны с выделением гистамина из клетки-мишени. Аналогичное взаимодействие внутри одной молекулы IgE вызывает в большей степени блокирование выделения гистамина. Таким образом, небольшие молекулы аллергенов (например, мажорный аллерген пыльцы березы Bet v 1) не могут формировать интрамолекулярные мостики внутри комплекса с одной молекулой IgE, но также и слишком малы, чтобы связать рядом находящиеся молекулы антитела, обеспечив тем самым поперечную сшивку рецепторов, необходимую для активации клетки [13]. Однако эти молекулы могут в физиологическом растворе формировать димеры и олигомеры, способные проявлять биологическую активность [12, 13]. При этом протеин T1, неаллергенный гомолог Bet v 1, не способен к гомо- и олигомеризации [13]. Из всего сказанного логично вытекает вывод о том, что уровень сенсibilизации к аллергену зависит от его структуры

больше, нежели от особенностей иммунологической реактивности пациента [13].

Дендритные клетки, используя свой репертуар паттерн-распознающих рецепторов, запускают активацию врожденного иммунного ответа, а также влияют на дальнейшее развитие адаптивного иммунитета [5]. Известно, что ряд патогенов некоторых микробов и гельминтов (например, *Helicobacter pylori* и *Schistosoma mansoni*) экспрессируют на своей поверхности фукозиллированные гликаны, которые зачастую ассоциированы с запуском Т-хелпер-2-зависимого адаптивного иммунного ответа [5].

С этих позиций интересным представляется исследование ответа дендритных клеток, запускающих иммунный ответ на аллерген, на антигены *Periplaneta americana*. Мономерный аллерген таракана Per a 3 был менее иммуногенным, чем его природная форма в виде гексамера. При взаимодействии дендритных клеток сенсibilизированных пациентов и здоровых доноров с антигеном наблюдалась преимущественно продукция цитокинов профиля Т-хелперов-1, в частности интерферона гамма (IFN γ). При контакте гексамерного аллергена с дендритными клетками только сенсibilизированных пациентов отмечена продукция цитокинов профиля Т-хелперов-2. Кроме того, в этом случае лейкоциты пациентов продуцировали лейкотриены [13].

Наличие повторяющихся эпитопов в молекуле антигена было показано для многих нативных молекул аллергенов: латекса, таракана, тропомиозина креветок, домашней пыли, пшеницы. Существенно то, что подавляющее большинство аллергенов креветок в нативном виде являются димерами или олигомерами. Результатом этих и других исследований явилось основание обозначать повторяющиеся олигомерные эпитопы в составе молекул аллергенов как ААМРs [12, 13].

По аналогии с РАМРs выделение термина ААМРs было бы полезным в понимании IgE-зависимой аллергии. Возможно, связывание молекул IgE, фиксированных на клетках, мономерными молекулами антигена, приводит к локальному повышению концентрации аллергена, что в дальнейшем способствует его димеризации и поперечной сшивке рецепторов [12]. Это актуально для протеинов с малым количеством эпитопов. Такие антигены, как аллерген пыльцы березы (Bet v 1), домашнего клеща (Der p 1), амброзии (Ambr a 5), имеют по одному доминантному эпитопу. Однако в процессе исследования при помощи спектрометрии обнаружено, что они

формируют транзиторные димеры и тримеры в растворе.

Наиболее интересным примером является пищевой аллерген арахиса Ara h 1, который становится аллергическим в процессе обжаривания, способствующего стабильной тримеризации молекулы. Тот факт, что варка вызывает формирование гипоаллергенных агрегатов, которые отличаются от тех, что получаются при обжаривании, демонстрирует важность способа приготовления пищи [12].

Хотя большинство пищевых антигенов под влиянием пищеварительных ферментов подвергаются расщеплению и денатурации, некоторые из них остаются в неизменном виде. Неизменные пищевые аллергены обнаружены в сыворотке после их приема в пищу. Показано, что прием препаратов для лечения язвенной болезни, подавляющих переваривающую активность желудочного сока, оказывает влияние как на индуктивную стадию аллергической реакции, так и на стадию сенсibilизации [14].

В структуре аллергенов выделяют видоспецифические аллергены, которые определяют первичную сенсibilизацию, и так называемые паналлергены. К ним относятся профилины, неспецифические переносчики липидов (LTP), белки запаса семян, полкальцины. Паналлергены имеют широкое распространение и определяют перекрестную реактивность. К паналлергенам относят, например, аллергены домашнего клеща, аллергены тигровой креветки, альбумин бычьей сыворотки, которые обладают перекрестной реактивностью с сывороточным альбумином овец, свиней, собак и кошек. Кроме того, альбумин бычьей сыворотки является главным аллергеном при аллергии к говядине, но структурные модификации в результате нагревания или химической денатурации не влияют на аллергенность альбумина бычьей сыворотки [14]. Способность сохранять аллергенность в результате денатурации или переваривания является отражением особенностей структуры молекулы аллергена. IgE-связывающие эпитопы можно разделить на линейные и конформационные [9, 14]. Линейные образованы последовательностью аминокислот. Конформационные возникают в результате пространственной ориентации первичной аминокислотной последовательности и состоят из участков цепи, сближенных между собой.

Важность этого факта демонстрируют наблюдения, связанные с открытием молекулы Act d 11, являющейся аллергеном киви. Изучение молекулярной структуры этой аллергенной молекулы

дало возможность понять имеющуюся перекрестную реактивность между этим аллергеном и аллергенами березы, в частности Bet v 1. Поскольку гомологичность аминокислотной последовательности Act d1 1 и белков Bet v 1 составляет менее 21%, можно было бы предположить, что перекрестные реакции между этими аллергенами маловероятны. Судя по аминокислотной последовательности, Act d 11 имеет гораздо большее сходство с аллергенами латекса. Однако при изучении 3D-структуры молекулы Act d 11 показано, что конформация молекулы приводит к формированию эпитопов, схожих по строению с Bet v 1 и некоторыми другими белками. Этим можно объяснить возможность перекрестного распознавания данных аллергенов [15]. Молекулы некоторых аллергенов могут менять свою антигенную структуру и свойства в зависимости от условий микроокружения и экспериментальных условий [15]. В исследованиях показано, что многие эпитопы, связывающиеся с IgE, имеют 3D-структуру: лизоцим (Gal d 4), β -лактоглобулин (Bos d 5), латекс (Hev b 6), аллерген пыльцы березы (Bet v 1) [14].

Количество и расстояние между эпитопами в молекуле аллергена, пространственная конфигурация молекул некоторых аллергенов, дополнительная обработка аллергенов (например, при приготовлении пищи), а также наличие повторяющихся олигомерных антигенных детерминант определяют право концепции AAMPs на существование [12, 13].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Medzhitov R. Pattern recognition theory and the launch of modern innate immunity. *Immunol.* 2013; 191 (3): 4473–4474. DOI: 10.4049/jimmunol.1302427.
- Gayed P.M. Toward a modern synthesis of immunity: Charles A. Janeway Jr. and the immunologist's dirty little secret. *Yale J. Biology Medicine.* 2011; 84: 131–138.
- Platzer B., Baker K., Vera M.P., Singer K., Panduro M., Lexmond W.S., Turner D., Vargas S.O., Kinet J.-P., Maurer D., Baron R.M., Blumberg R.S., Fiebiger E. Dendritic cell-bound IgE functions to restrain allergic inflammation at mucosal sites. *Mucosal Immunology.* 2015; 8 (3): 516–532. DOI: 10.1038/mi.2014.85.
- Eberle G. Immunity by equilibrium. *Nature Reviews | Immunology.* 2016; 16: 524–532.
- Hsu S.-C., Chen C.-H., Tsai S.-H., Kawasaki H., Hung C.-H., Chu Y.-T., Chang H.-W., Zhou Y., Fu J., Plunkett B., Su S.-N., Vieths S., Lee R. T., Lee Y.C., Huang S.-K. Functional interaction of common allergens and a C-type lectin receptor, dendritic cell-specific ICAM3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN), on human dendritic cells. *Journal Biol. Chemistry.* 2010; 285 (11): 7903–7910. DOI: 10.1074/jbc.M109.058370.
- Asam C., Hofer H., Wolf M., Aglas L., Wallner M. Tree pollen allergens – an update from a molecular perspective. *Allergy.* 2015; 70: 1201–1211. DOI: 10.1111/all.12696
- Lambrecht B.N., Hammad H. The immunology of asthma. *Nature Immunology.* 2015; 16 (1): 45–56. DOI: 10.1038/ni.3049.
- Kraft S., Kinet J.-P. New developments in Fc ϵ RI regulation, function and inhibition. *Nature Reviews. Nat Rev Immunology.* 2007; 7: 365–378. DOI: 10.1038/nri2072.
- Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010: 752. [Yarilin A.A. Immunology. M.: GEOTAR-Media Publ., 2010: 752 (in Russ.).]
- Yang J., Reth M. The dissociation activation model of B cell antigen receptor triggering. *FEBS Letters.* 2010; 584: 4872–4877. 10.1016/j.febslet.2010.09.045/full
- Holgate S.T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature medicine.* 2012; 18 (5): 673–683. DOI: 10.1038/nm.2731.
- Pali-Schöll I., Jensen-Jarolim E. The concept of allergen-associated molecular patterns (AAMP). *Current Opinion in Immunology.* 2016; 42: 113–118. DOI: org/10.1016/j.coi.2016.08.004.
- Jensen-Jarolim E., Mechtcheriakova D., Pali-Schöll I. The targets of IgE: allergen-associated and tumor-associated molecular patterns. Penichet M.L., Jensen-Jarolim E. (eds.), *Cancer and IgE.* Springer Science + Business Media, LLC. 2010; 231–254. DOI: 10.1007/978-1-60761-451-7_10.
- Matsuo H., Yokoo JT., Taogoshi T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergology International.* 2015; 64 (4): 332–343.
- Alessandri C., Ferrara R., Bernardi M.L., Zennaro D., Tuppo L., Giangrieco I., Tamburrini M., Mari A., Ciar-diello M.A. Diagnosing allergic sensitizations in the third millennium: why clinicians should know allergen molecule structures. *Clin. Transl. Allergy.* 2017; 7 (21): 1–9. doi 10.1186/s13601-017-0158-7.

Сведения об авторах

Свиридова Валентина Сергеевна, канд. мед. наук, ассистент, кафедра иммунологии и аллергологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-7594-6800.

Authors information

Sviridova Valentina S., PhD, Assistant, Immunology and Allergology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-7594-6800.

Исаев Павел Юрьевич, ассистент, кафедра иммунологии и аллергологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-9831-4814.

Климов Владимир Васильевич, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой иммунологии и аллергологии, СибГМУ г. Томск. ORCID iD 0000-0001-6673-7556.

Романова Мария Ивановна, ординатор, кафедра иммунологии и аллергологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-1314-2625.

Кошкарлова Наталья Сергеевна, канд. мед. наук, ассистент, кафедра иммунологии и аллергологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-6032-2402.

(✉) **Свиридова Валентина Сергеевна**, e-mail: VSSviridova@mail.ru.

Isaev Pavel Yu., Assistant, Immunology and Allergology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-9831-4814.

Klimov Vladimir V., DM, Professor, Head of Immunology and Allergology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-6673-7556.

Romanova Maria I., Physician, Immunology and Allergology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1314-2625.

Koshkarova Natalia S., PhD, Assistant, Immunology and Allergology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-6032-2402.

(✉) **Sviridova Valentina S.**, e-mail: VSSviridova@mail.ru.

Поступила в редакцию 04.02.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Received 04.02.2018

Accepted 17.12.2018

Иммунофармакологические аспекты системы цитокинов

Симбирцев А.С.

Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов
Россия, 197110, г. Санкт-Петербург, Пудожская ул., 7

РЕЗЮМЕ

Цитокины – это уникальное семейство эндогенных полипептидных медиаторов межклеточного взаимодействия. С точки зрения иммунофармакологии, цитокины могут быть выделены как отдельный класс иммунорегуляторных молекул, имеющих ряд общих биохимических свойств и плеiotропный тип биологического действия. В системе цитокиновой регуляции и снижение, и возрастание уровней цитокинов могут стать причиной патологии. В организме существует несколько механизмов контроля для предотвращения возрастания уровня цитокинов, что позволяет избежать развития патологических изменений, обусловленных их гиперпродукцией. Синтезируясь одновременно, цитокины формируют цитокиновую цепь, когда удаление любого звена приводит к разрыву всего механизма формирования иммунновоспалительного процесса.

У цитокинов как класса лекарственных препаратов есть безусловные преимущества, но и определенные недостатки, к которым относятся особенности фармакокинетики с коротким периодом циркуляции; побочные эффекты, связанные с плеiotропным механизмом биологического действия, инъекционные формы. Рациональные подходы к клиническому использованию цитокинов заключаются в разработке пролонгированных лекарственных форм препаратов цитокинов, создании препаратов для местного применения и методов персонализированной цитокиновой терапии.

Ключевые слова: цитокины, цитокиновая регуляция, цитокиновая терапия, иммунофармакология.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Симбирцев А.С. Иммунофармакологические аспекты системы цитокинов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 84–95. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-84-95](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-84-95).

Immunopharmacological aspects of the cytokine system

Simbirtsev A.S.

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations
7, Pudozhskaya Str., St. Petersburg, 197110, Russian Federation

ABSTRACT

Cytokines represent a unique family of endogenous polypeptide mediators of intercellular interaction. From an immunopharmacological point of view cytokines can be marked out as a new, separate immunoregulatory molecule system and have some common biochemical properties and pleiotropic type of biological activity. In the cytokine regulatory system both reduction and elevation of cytokine levels can cause pathology. Several endogenous systems exist to control cytokine elevation and prevent tissue pathology. When synthesized simultaneously, cytokines form a cytokine chain. Deletion of any unit of this chain leads to the break in the formation of immunopathology. Cytokines as therapeutic preparations have evident advantages but also some limitations such as pharmacokinetics with short circulation period, adverse effects due to pleiotropic mode of action, and injectable drug forms. Rational design for clinical cytokine application could be linked with the development of prolonged and local drug forms or personalized cytokine therapy.

Key words: cytokine system, immunopharmacology.

Conflict of interest. The author declares the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The author states that there is no funding for the study.

For citation: Simbirtsev A.S. Immunopharmacological aspects of the cytokine system. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 84–95. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-84-95>.

Цитокины – это уникальное семейство эндогенных полипептидных медиаторов межклеточного взаимодействия, насчитывающее около 300 индивидуальных веществ. К цитокинам относятся следующие основные группы медиаторов:

1. Интерфероны.
2. Интерлейкины.
3. Хемокины.

4. Цитокины из группы фактора некроза опухоли.

5. Ростовые и дифференцировочные факторы.

Цитокины разделяются на подсемейства и отдельные группы на основе структурно-функциональной классификации, где предпринята попытка учесть генетические особенности, биохимические свойства, строение рецепторов и биологические функции этих молекул [1]. Что же с точки зрения иммунофармакологии характеризует и объединяет цитокины как отдельный тип регуляторных молекул? Эти принципиально важные свойства заключаются в следующем.

Цитокины являются гликозилированными полипептидами с молекулярной массой (ММ) 5–50 кДа, могут состоять из одной, двух и более одинаковых или разных субъединиц, которые синтезируются различными по гистогенетическому происхождению типами клеток и далее либо секретируются, либо существуют в виде биологически активной мембранной формы. Все цитокины действуют на клетки-мишени посредством высокоаффинного взаимодействия со специфическими

рецепторными комплексами. Важнейшее свойство большинства цитокинов – плеiotропность биологического действия, когда одна молекула цитокина способна вызвать в организме одновременно несколько биологических эффектов вследствие экспрессии рецепторов на разных типах клеток в разных органах. С этим связана и частичная взаимозаменяемость биологического действия, когда принадлежащие к разным подгруппам цитокины могут иметь некоторые похожие биологические свойства. Цитокины в основном служат коротко-дистантными медиаторами и проявляют свои свойства при межклеточном взаимодействии либо локально в очаге воспаления или в лимфоидных органах. Однако некоторые цитокины проявляют свою активность системно, синтезируясь в одних органах, а действуя на клетки других, проникая туда по кровеносным и лимфатическим сосудам, как это делают гормоны.

Цитокиновая регуляция иммунитета осуществляется на всех этапах индивидуального развития и по разным направлениям:

1. Регуляция миграции клеток в эмбриогенезе, закладки и развития органов иммунной системы.
2. Контроль образования клеток иммунной системы путем регуляции костномозгового кроветворения и созревания лимфоцитов в тимусе.
3. Регуляция воспаления на местном и системном уровне.
4. Регуляция приобретенного иммунитета за счет контроля всех стадий антиген-специфиче-

ской пролиферации, дифференцировки и функциональной активности Т- и В-лимфоцитов.

5. Регуляция регенерации тканей.

Регуляция этих основных функций делает цитокины ключевыми факторами патогенеза инфекционных, аллергических, аутоиммунных, аутовоспалительных заболеваний, метаболических нарушений и рака. При этом к патологии могут приводить как изменения количества одного или нескольких цитокинов, так и изменения баланса про- и противовоспалительных цитокинов либо цитокинов, регулирующих формы развития приобретенного иммунитета. Можно выделить три основных варианта нарушений продукции цитокинов при заболеваниях человека:

1. Недостаточность продукции (в том числе за счет подавления синтеза патогенами) – бактериальные, вирусные и другие инфекции.

2. Гиперпродукция – септический шок, аутовоспалительные и аутоиммунные процессы.

3. Дисбаланс продукции – аллергия, некоторые аутоиммунные реакции, некоторые инфекции, невынашивание беременности.

Как избыток, так и недостаток синтеза эндогенных цитокинов могут стать причиной развития патологии. Безусловно, ведущая роль в патогенезе целого ряда иммуновоспалительных процессов, часто служащих причиной формирования социально значимых заболеваний, ставят цитокины в ряд очень привлекательных молекул в плане возможного терапевтического использования. При этом многогранность биологических эффектов, одновременное комплексное действие на разные стороны регуляции иммунологических реакций делают весьма затруднительным отнесение цитокинов в какой-либо раздел любой из существующих классификаций иммуноотропных препаратов. Видимо, целесообразно выделять цитокины как самостоятельный класс иммунорегуляторных молекул, причем для каждого из цитокинов должны быть описаны индивидуальный набор иммунорегуляторных свойств и возможные особенности назначения при различных заболеваниях.

В клинической практике существуют два принципиальных направления воздействия на систему цитокинов:

1. Цитокиновая терапия, направленная на устранение недостатка синтеза эндогенных цитокинов либо на временное увеличение концентрации нужных медиаторов с целью активации противоинфекционного или противоопухолевого иммунитета, усиления кроветворения, искусственного изменения баланса цитокинов при иммунопатологических состояниях, например

при аллергии. При этом следует учитывать, что больному в качестве лекарственных препаратов вводятся цитокины, синтез которых в определенных количествах происходит в организме. Поэтому при идеальном иммунофармакологическом контроле должна учитываться суммарная концентрация эндогенных и экзогенных цитокинов, позволяющая осуществить персонализированный подход к цитокиновой терапии.

2. Антицитокиновая терапия, направленная на блокирование биологического действия цитокинов в тех случаях, когда эндогенные цитокины синтезируются в избытке, или есть дисбаланс продукции, что становится причиной развития патологических изменений в органах и тканях.

Отдельным активно развивающимся терапевтическим направлением является генотерапия для коррекции генетических дефектов в системе цитокинов либо изменения баланса синтеза эндогенных цитокинов при иммуновоспалительных процессах и лечении опухолей.

Цитокины связываются со специфическими рецепторами и действуют на клетки-мишени в наноконцентрациях, поэтому получение, очистка и стандартизация значимого количества этих медиаторов из естественных источников для лечебного использования практически невозможны. Будущее цитокиновой терапии связано с генно-инженерными препаратами, получаемыми с использованием высокопродуктивных штаммов-продуцентов, в том числе эукариотических клеток. Получение генно-инженерных препаратов цитокинов основано на воспроизводстве структурно-функциональных аналогов биологически активных молекул, синтезируемых клетками организма. Смысл производства данных препаратов заключается в повторении методами биотехнологии уникальных биологических свойств молекул, созданных природой в течение миллионов лет эволюции и не имеющих равных среди искусственно конструируемых лекарств.

Получаемые биотехнологическими методами рекомбинантные аналоги цитокинов не только повторяют биологические свойства природных молекул, но могут быть генетически модифицированы с целью достижения иммунофармакологических свойств, нужных для вводимых извне лекарственных препаратов, например получения пролонгированных лекарственных форм.

Преимущества применения рекомбинантных цитокинов в качестве лекарственных средств заключаются в следующем:

1. Индивидуальные, полностью охарактеризованные по биохимическим и биологическим свой-

ствам рекомбинантные молекулы, идентичные эндогенным цитокинам.

2. Стандартизованный процесс производства и контроля качества.

3. Иммунофармакологическая характеристика и известный механизм действия.

4. Возможность сочетания с химиотерапией и другими способами терапии.

Сказанное может быть проиллюстрировано на примере рекомбинантного эритропоэтина (ЭПО) – одного из первых и до сих пор наиболее востребованных генно-инженерных препаратов на основе цитокинов. ЭПО применяется для лечения любых видов анемии, но является препаратом выбора у больных с хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе, когда помимо очистительной функции почек, корректируемой гемодиализом, нарушается функция синтеза эндогенного ЭПО клетками почечного эпителия. У взрослых практически весь ЭПО синтезируется в почках. В нормальных физиологических условиях устанавливается конститутивный невысокий уровень экспрессии гена и происходит синтез ЭПО, достаточный для поддержания нормального эритропоэза. У здорового взрослого человека ЭПО постоянно находится в плазме крови в концентрациях 10–15 мМЕ/мл. При травмах и больших кровопотерях скорость образования эритроцитов может увеличиваться в 10–12 раз, и это связано с 1 000-кратным возрастанием уровня экспрессии гена ЭПО и ростом его концентрации в плазме периферической крови до 10 000 мМЕ/мл. Период полужизни ЭПО в плазме крови человека составляет 6–10 ч.

При почечной недостаточности этот физиологический механизм регуляции синтеза ЭПО по принципу отрицательной обратной связи не срабатывает, клетки пораженного эпителия не могут справиться с потребностями увеличения его продукции, и постепенно развивается состояние анемии с соответствующими гематологическими и кардиологическими осложнениями. В этом случае введение в организм больного препарата рекомбинантного ЭПО полностью заменяет эндогенный цитокин. Назначение ЭПО должно проводиться в строго подобранных дозировках в некоторых случаях индивидуально, так как недостаточные дозы не смогут в полном объеме компенсировать явления анемии, а передозировка может привести к серьезным нежелательным последствиям в виде гиперпродукции эритроцитов, нарушениям гематокрита и т.д.

Биологически активный ЭПО должен обязательно быть гликозилирован. Кроме того, гли-

козилирование имеет значение для оптимальных показателей фармакокинетики при введении в организм человека. Именно особенности гликозилирования стали основой создания препарата ЭПО с улучшенными показателями фармакокинетики. Новый препарат под названием «дарбэпоэтин» – пример пролонгированной формы, полученной генно-инженерным способом путем изменения аминокислотного остатка в последовательности белка. Это практически не сказалось на биологической активности, но привело к появлению нового сайта для интенсивного гликозилирования, увеличению молекулярной массы ЭПО за счет углеводных остатков, существенному изменению фармакокинетики, значительному увеличению времени циркуляции введенного рекомбинантного препарата в организме и увеличению биодоступности. Дарбэпоэтин может вводиться пациентам 1 раз в неделю, тогда как при лечении анемии у больных с почечной недостаточностью стандартные препараты ЭПО вводят 3 раза в неделю [2].

Все это касается регуляции эритропоэза, но ЭПО является типичным плейотропным цитокином, обладающим еще рядом интересных свойств. Оказалось, что рецепторы ЭПО, кроме эритроидных предшественников различных стадий дифференцировки, экспрессируются на клетках эндотелия, эпителиальных, гладкомышечных клетках, астроцитах, нейронах. ЭПО активирует систему фактора роста сосудистого эндотелия и его рецепторов и тем самым стимулирует рост сосудов, а также блокирует апоптоз клеток путем активации транскрипционного фактора Bcl-2 и инактивации каспаз [3]. Следовательно, ЭПО при травмах кроме прямой активации эритропоэза для компенсации кровопотери стимулирует неоангиогенез, увеличивает пролиферацию и выживаемость клеток для обеспечения посттравматической регенерации тканей. В этом заключается смысл плейотропного биологического действия большинства цитокинов как класса биологических молекул, когда на первый взгляд совершенно разнонаправленные эффекты в итоге складываются в единую систему обеспечения восстановления гомеостаза. В случае ЭПО – это усиление эритропоэза и одновременно стимуляция регенерации при травмах. При этом одна и та же молекула стимулирует разные физиологические функции, необходимые для восстановления нарушенного гомеостаза на уровне целостного организма.

Возвращаясь к особенностям гликозилирования цитокинов, следует отметить, что нали-

чие некоторого количества углеводных остатков является обычным явлением для этого класса белков. Углеводные остатки важны для оптимальной фармакокинетики, блокирования сайтов для действия протеолитических ферментов и блокирования эпитопов для возможного формирования аутоантител. В отличие от ЭПО, гликозилирование чаще всего не сказывается на биологической активности большинства цитокинов, однако оказывает влияние на фармакокинетику. Данные закономерности можно проследить на примере сравнения различных препаратов рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Г-КСФ является одним из важнейших ростовых факторов для нейтрофильных гранулоцитов, основных участников реакций врожденного иммунитета. Главное направление клинического использования Г-КСФ – восстановление числа гранулоцитов в периферической крови, сниженного в результате химиотерапии рака.

В настоящее время в клинической практике используются два основных варианта рекомбинантного Г-КСФ человека: негликозилированный Г-КСФ, получаемый в *E. coli*, и гликозилированный Г-КСФ, получаемый из трансформированных клеток СНО (Chinese hamster ovary cells). Присоединение углеводов абсолютно не влияет на взаимодействие с рецептором и на биологическую активность, и по клиническим данным гликозилированный и негликозилированный Г-КСФ ничем не отличаются друг от друга. Тем не менее гликозилированный Г-КСФ имеет лучшую фармакокинетику и больший период полувыведения из кровотока (различия составляют 12–17%), поэтому при его клиническом использовании могут быть применены несколько меньшие дозировки. В клинике также применяется препарат Г-КСФ с пролонгированным действием на основе полиэтиленгликоля, что позволяет уменьшить число введений препарата и улучшить фармакокинетику с достижением более плавной кривой изменения концентрации Г-КСФ в циркуляции [4].

Препараты на основе интерферона I типа (ИФН) являются классическим примером многогранного биологического действия цитокинов. Среди разных типов ИФН наибольшим преимуществом в плане клинического использования обладает интерферон альфа-2b, так как эта форма ИФН вызывает минимальный рост титра нейтрализующих аутоантител при длительных либо повторных курсах лечения вирусных инфекционных заболеваний и опухолей. ИФН проявляют следующие биологические свойства:

1. Прямое противовирусное действие за счет индукции экспрессии интерферон-стимулированных генов и синтеза продуктов этих генов, обладающих противовирусной активностью [5, 6].

2. Активация функций натуральных киллеров, обладающих способностью лизировать инфицированные вирусом клетки [7].

3. Усиление экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости I класса, необходимое для увеличения эффективности представления вирусных антигенов инфицированными клетками цитотоксическим Т-лимфоцитам и их распознавания [8].

4. Усиление функциональной активности цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов для антиген-специфического лизиса вирус-инфицированных клеток-мишеней [9].

5. Стимуляция дифференцировки и функциональной активности CD4⁺ Т-лимфоцитов хелперов 1-го типа (Th1) для усиления клеточного противовирусного иммунитета.

6. Подавление активности FoxP3⁺ Т-регуляторных лимфоцитов (T-reg) для снижения их ингибирующего влияния на развитие противовирусного иммунитета [10].

В результате помимо прямого антивирусного действия на любые клетки, в том числе не относящиеся к клеткам иммунной системы, активируются механизмы как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Это пример того, как одна небольшая молекула цитокина с ММ почти в 10 раз меньше ММ молекул антител способна за счет плейотропного типа биологического действия активировать совершенно разные механизмы защитных реакций с участием разных типов клеток, направленные на выполнение одной цели – удаление проникшего в организм вируса.

Преимущество интерферонов перед другими противовирусными препаратами заключается в том, что на клеточном уровне ИФН обладает противовирусной активностью в отношении практически всех типов ДНК- и РНК-вирусов, запуская в клетках программу экспрессии ИФН-стимулированных генов и синтеза антивирусных защитных факторов. На уровне организма ИФН активирует реакции врожденного (НК-клетки) и приобретенного (модуляция активности различных типов Т-лимфоцитов) противовирусного иммунитета. Поэтому все ИФН кроме противовирусной активности обладают также иммунорегуляторным действием, и это важно знать не только иммунофармакологу, но и клиническому иммунологу при назначении данных препаратов. В результате комплексного действия ИФН происходит вовле-

чение всех возможных противовирусных механизмов в организацию единой защитной реакции организма против внедрившегося вируса. Этим ИФН выгодно отличается от большинства противовирусных химических препаратов, обладающих лишь отдельными типами противовирусного действия обычно в отношении узкого круга тех или иных вирусов. К какой группе иммуномодуляторов может быть отнесен лекарственный препарат ИФН, если он одновременно действует на врожденный и приобретенный иммунитет? Пример ИФН еще раз убеждает, что цитокины как разновидность эндогенных иммуномодуляторов должны быть выделены в особую группу.

Помимо интерферонов наиболее ярко многогранное действие с множеством биологических эффектов проявляется у так называемых провоспалительных цитокинов: интерлейкина (ИЛ) 1, фактора некроза опухоли (ФНО), ИЛ-6. Эти цитокины стимулируют местную и системную воспалительную реакцию с участием всех известных механизмов провоспалительного действия с дальнейшим переходом к активации приобретенного иммунитета. В клинической практике препараты на основе рекомбинантного ИЛ-1 бета обладают колоссальным лечебным потенциалом для стимуляции противoinфекционного иммунитета в случае вторичных иммунодефицитных состояний; для активации костномозгового кроветворения, прежде всего восстановления миелопоэза после курсов химиотерапии у больных раком; для усиления регенерации при кожных ранах и трофических язвах. То есть в реальной медицинской работе удалось научиться применить по назначению многочисленные и в то же время уникальные свойства одного из плейотропных провоспалительных медиаторов [11].

Однако иногда в клинической практике плейотропный тип биологической активности препаратов цитокинов может иметь и негативные последствия, так как ведет к целому ряду побочных эффектов, обычно в виде повышения температуры, развития гриппоподобного комплекса и т.п. В физиологических дозах (например, указанных в инструкции по применению препарата рекомбинантного ИЛ-1 бета) эти явления минимальны, но даже небольшое превышение дозировок при введении больному может привести к их развитию, т. е. у препаратов цитокинов очень мал диапазон между терапевтической и токсической дозами. И это одна из серьезных иммунофармакологических проблем терапевтического использования цитокинов. Если это так, то возникает вопрос, как эндогенные цитокины функционируют

в организме, в частности цитокины, обладающие мощным провоспалительным потенциалом?

Характер действия цитокинов зависит от их уровня в биологических средах организма. В относительно низких, правильнее сказать, нормальных физиологических концентрациях, цитокины абсолютно необходимы для формирования местной воспалительной реакции в тканях и противoinфекционного ответа. При этом следует учесть, что индукция синтеза провоспалительных цитокинов и интерферонов I и III типов и их появление в тканях служат выполнению конкретной цели, например быстрой блокаде и удалению попавшего в организм патогена и восстановлению структуры органов. Длительное хроническое возрастание уровня цитокинов может приводить к нарушениям иммунологической реактивности. Кратковременное увеличение при острых вирусных и бактериальных инфекциях ведет к индукции экспрессии генов противoinфекционного ответа, активации клеток иммунной системы, подавлению репликации вирусов и усилению фагоцитоза микроорганизмов. В то же время длительное увеличение уровня цитокинов при хронических инфекциях может приводить к индукции синтеза иммуносупрессорных медиаторов: ИЛ-10 и трансформирующего ростового фактора бета (ТРФβ), нарушениям клеточного состава и структуры лимфоидных органов, фиброзированию тканей [12–15].

Острое возрастание уровня цитокинов в циркуляции приводит к развитию защитной системной воспалительной реакции, иногда называемой цитокиновым штормом, в некоторых случаях с характерными клиническими проявлениями, и физиологически оправдано, так как требуется для вовлечения всех органов и систем организма для организации единой защитной реакции при серьезном нарушении гомеостаза. Однако патологически высокая концентрация провоспалительных цитокинов может вызвать септический шок и гибель организма. В ситуациях, когда уровень цитокинов длительное время превышает физиологическую концентрацию, они становятся уже не медиаторами защиты, а медиаторами развития патологии, а в случаях острого нарастания уровня при септическом шоке, остром отеке легких – медиаторами смерти.

В связи с этим появилось понимание того неоспоримого факта, что цитокины при неадекватном синтезе могут оказывать повреждающее действие на ткани и быть причиной развития патологии различных органов. На этом базисе сформировались цитокиновая теория развития

заболеваний [16, 17] и понятие цитокин-опосредованных заболеваний. При несбалансированном остром или хроническом увеличении продукции эндогенные цитокины служат причиной развития целого ряда известных цитокин-опосредованных аутоиммунных, аутовоспалительных, аллергических заболеваний и сепсиса, а также сравнительно недавно описанных проявлений метаболического синдрома [18], синдромов иммунного восстановления при ВИЧ-инфекции [19], активации синтеза цитокинов при терапии рака CAR T-лимфоцитами [20] и некоторых других состояниях.

Важно, что цитокины при всех перечисленных вариантах развития заболеваний не являются первичными медиаторами патологии за исключением состояний, связанных с наследственными генетическими нарушениями цитокиновой регуляции. Действие цитокинов – составная часть иммунопатогенеза большинства заболеваний, и они выступают как медиаторы нарушенной неправильной работы иммунной системы. С учетом данных особенностей функционирования системы цитокинов сформировалось отдельное направление терапии, названное антицитокиновой терапией, связанной с удалением из организма или блокированием биологической активности эндогенных цитокинов.

Успехи этой терапии очевидны, прежде всего, при аутоиммунных, а также и при многих других иммуновоспалительных заболеваниях. Но на самом деле природой давно созданы антицитокиновые механизмы контроля и четко организована тонкая регуляция любого возможного увеличения концентрации в тканях. Уже локально в местах синтеза и действия цитокинов клетки-мишени продуцируют особый тип специфических рецепторов, связывающих молекулы цитокинов и блокирующих их биологическую активность. Подобные растворимые рецепторы, связывающие цитокины с высокой аффинностью, сравнимой с мембранными рецепторами, описаны для основных провоспалительных цитокинов: ФНО, ИЛ-1, ИЛ-6, для ИЛ-2 и ряда других [21–24]. На клеточном уровне проведение сигнала и активация клеток после связывания цитокинов с мембранными рецепторами регулируются с помощью внутриклеточных белков – супрессоров цитокинового сигналинга (suppressors of cytokine signaling, SOCS). Появляясь в цитоплазме клеток, SOCS связываются с молекулами Janus киназ и блокируют весь путь передачи сигнала с участием транскрипционных факторов STAT (signal transducer and activator of transcription) [25]. Экспрессия и синтез растворимых рецепторов и вну-

триклеточных SOCS усиливаются вместе с увеличением синтеза цитокинов и служат для контроля превышения их физиологических концентраций по принципу отрицательной обратной связи.

Важнейший для системы цитокинов уровень контроля связан с конститутивным синтезом и постоянной циркуляцией в плазме периферической крови специфических блокаторов многих провоспалительных цитокинов. Для ИЛ-1 – это рецепторный антагонист ИЛ-1 (РАИЛ-1), для ИЛ-36 – РАИЛ-36. Эти белки высокоаффинно взаимодействуют с рецепторами указанных цитокинов, но не способны обеспечить проведение сигнала, при этом рецепторы оказываются занятыми и недоступными для биологически активных агонистов. РАИЛ-1 находится в плазме крови в достаточно высокой концентрации до 1 нг/мл [26], и увеличение уровня ИЛ-1 блокируется предсуществующим ингибитором, выполняющим роль своеобразного буфера. Лишь значительное возрастание концентрации ИЛ-1 в межклеточном пространстве и затем в циркуляции может сместить равновесие в сторону проявления биологического действия агониста. Для ИЛ-18 также существует специфический ингибитор, который действует несколько иначе, прямо связывая и нейтрализуя действие ИЛ-18 в биологических жидкостях.

Косвенным образом в оптимизации синтеза цитокинов участвуют и клоны Т-регуляторных лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, синтезирующие противовоспалительные цитокины ИЛ-10, ИЛ-35 и ТРФβ. Т-рег подавляют активацию и синтез цитокинов клонами $Tx1$, $Tx2$, $Tx17$ и за счет этого выполняют функции контроля гиперактивации иммунной системы [27].

Наконец, на уровне организма в контроле уровня цитокинов участвует нейроэндокринная система. Появление провоспалительных цитокинов в кровотоке приводит к быстрому и значительному увеличению синтеза стероидных гормонов в клетках коры надпочечников. Иммуносупрессивное действие стероидных гормонов как раз связано с подавлением экспрессии генов цитокинов. В данном случае также действует механизм отрицательной обратной связи для контроля чрезмерного повышения синтеза цитокинов. Таким образом, в организме существует несколько механизмов контроля для предотвращения возрастания уровней цитокинов, что позволяет избежать развития патологических изменений, обусловленных их гиперпродукцией.

Почему необходим такой разносторонний контроль за избыточным синтезом цитокинов,

становится понятно из анализа клинических проявлений последствий нарушений этих механизмов в силу генетических дефектов, функциональных изменений регуляции или ятрогенных воздействий. Исследованные к настоящему времени генетические дефекты, касающиеся системы цитокинов, затрагивают гены самих цитокинов, их рецепторов и внутриклеточных молекул, обеспечивающих проведение активационного сигнала после взаимодействия цитокинов со специфическими рецепторами. Обычно мутации в генах цитокинов и регуляторных молекул приводят к нарушению развития защитных реакций организма. При этом клинические проявления связаны с развитием характерных для каждого генетического дефекта инфекционных заболеваний, вызванных вирусными, бактериальными или грибковыми патогенами [28]. Именно эти разные клинические черты каждого иммунодефицита, связанного с цитокиновой регуляцией, представляют собой бесценный материал для понимания конкретной роли отдельных цитокинов в регуляции противинфекционного иммунитета и иммунной системы в целом у человека.

Однако есть группа генетических дефектов, связанных с мутациями в генах, обеспечивающих регуляцию синтеза цитокинов. Эти мутации приводят к нарушениям нормальной регуляции либо касаются генов антагонистов цитокинов, о роли которых сказано выше, и ведут не к снижению, а, напротив, к повышению синтеза цитокинов. Такие нарушения описаны для ИЛ-1, ИФН α и некоторых других медиаторов и объединены понятием аутовоспалительных синдромов. Клинически аутовоспалительные синдромы характеризуются эпизодическими неинфекционными воспалительными проявлениями: необъяснимыми приступами лихорадки, кожными высыпаниями, серозитами, артралгиями, миалгиями, которые обычно разрешаются самопроизвольно. Эти симптомы не связаны с классическими проявлениями аутоиммунных процессов, в основном вызванных нарушениями приобретенного иммунитета, а зависят от генетических дефектов функционирования системы цитокинов [29, 30].

С увеличением синтеза ИЛ-1 ассоциированы несколько незначительно различающихся по клиническим проявлениям аутовоспалительных синдромов, связанных с различными мутациями в гене *NLRP3*, кодирующем один из белков в составе инфламмасомы. Эти генетические дефекты приводят к нарушению нормального функционирования инфламماسом, отсутствию должного контроля за активностью фермента каспазы-1,

возрастанию уровня процессинга предшественника и образования зрелого биологически активного ИЛ-1 β [31]. Суть проявлений хронического аутовоспаления вследствие нарушения нормальной работы инфламماسом, ведущей к гиперпродукции ИЛ-1 β , подтвердилась после открытия еще одного уникального первичного иммунодефицита, обусловленного мутацией гена *RAIL-1* и названного DIRA (deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist) [32]. Мутация гена *IL1RN* приводит к нарушению синтеза РАИЛ-1, падению его уровня в организме и отсутствию контроля за синтезом ИЛ-1. Клинические проявления при гомозиготном варианте наследования развиваются в детском возрасте и связаны с формированием асептического мультифокального остеомиелита, периостита и пустулезных кожных высыпаний. Терапия препаратом рекомбинантного РАИЛ-1 (анакинра), препаратами моноклональных антител к ИЛ-1 β или растворимых рецепторов ИЛ-1 приводит к быстрому и полному купированию всех клинических симптомов, подтверждая ключевую роль ИЛ-1 β в развитии патологии [33]. Частота встречаемости этих синдромов очень низка, однако они дают совершенно определенный ответ на вопрос, что происходит в организме при гиперпродукции ИЛ-1. Эти проявления связаны с изменениями системы кроветворения, полиорганным воспалением с вовлечением суставов, глаз и нервной системы.

В последние годы у человека описаны также генетические дефекты, связанные с повышенным синтезом ИФН I типа вследствие мутаций в генах, регулирующих его синтез. Хроническое повышение синтеза ИФН вызывает активацию клеток иммунной системы, синтез провоспалительных цитокинов и поэтому тоже может стать причиной развития аутовоспалительной патологии. В 2011 г. был предложен термин интерферопатии I типа (type I interferonopathy) [34], который в последнее время трансформировался в более широкое понятие аутовоспалительных заболеваний, связанных с ИФН (IFN-mediated autoinflammatory diseases, IMAD). Среди них есть несколько отдельных моногенных заболеваний, названных синдромами Экарди – Гутьер (Aicardi – Goutières) по фамилиям французских авторов, впервые описавших их клинические проявления [35]. Синдром Экарди – Гутьер проявляется уже в раннем детстве повышением уровня ИФН α в ликворе с проявлениями церебральной атрофии, лейкодистрофии, образованием кальцификатов мозговой ткани при отрицательных результатах серологического исследования на внутриутробные

инфекции. Причиной патологии является стерильное воспаление в результате гиперпродукции ИФН.

Недостаточность синтеза ИФН при генетических дефектах у человека приводит к нарушениям нормального противовирусного ответа с развитием тяжелых вирусных инфекций (менингиты и энцефалиты). В то же время повышение синтеза ИФН может приводить к развитию острого асептического воспаления с развитием дисфункции органов при тяжелых вирусных инфекциях, а хроническая гиперпродукция, в том числе при генетических интерферопатиях, — к формированию аутоиммунных заболеваний и аутовоспалительных синдромов. Следовательно, на примере одного из главных провоспалительных цитокинов — ИЛ-1 и на примере ключевого противовирусного цитокина — ИФН становится ясно, что в системе цитокиновой регуляции и снижение, и возрастание уровней цитокинов могут стать причиной патологии. Из этих выводов и стоит строить подходы к правильному иммунофармакологическому пониманию дозировок и схем назначения препаратов рекомбинантных цитокинов. То же относится и к терапевтическому воздействию на эндогенные цитокины в варианте антицитокиновой терапии.

Интересно, что анализ результатов антицитокиновой терапии, проведенной у десятков тысяч пациентов в основном для лечения аутоиммунных заболеваний, показал незаменимую роль каждого цитокина в иммунорегуляции. Действительно, блокирование одного лишь ФНО приводит к учащению развития инфекций (в частности, растет выявляемость туберкулеза). Назначение антицитокиновой терапии, специфически блокирующей только ИЛ-1 бета, тоже ведет к росту частоты развития инфекционных осложнений. Изучение спектра клинических проявлений при наследственных дефектах генов конкретных цитокинов и их рецепторов у человека также подтвердило уникальность и незаменимость каждого медиатора. При лечении больных ревматоидным артритом антицитокиновая терапия, приводящая к блокированию и ФНО, и ИЛ-1, и ИЛ-6, дает сходные клинические эффекты, заключающиеся в подавлении аутоиммунного воспаления и в значительном улучшении клинической симптоматики. У провоспалительных цитокинов не оказалось той взаимозаменяемости, которая могла бы быть ожидаема на основании анализа спектра перекрывающихся проявлений биологической активности.

Это означает, что в патогенезе иммуновоспалительных заболеваний цитокины формируют не

цитокиновую сеть с высокой взаимозаменяемостью и дублированием функций (как считалось ранее), а скорее цитокиновую цепь с уникальными функциями, когда удаление любого звена цепи приводит к разрыву всего механизма формирования иммуновоспалительного процесса. У каждого конкретного больного значение отдельных звеньев такой цепи в развитии патологии отличается и должно служить основанием для персонализированных подходов к антицитокиновой терапии. В клинической практике существует несколько биомаркеров, помогающих сделать такой выбор при назначении терапии. У больных ревматоидным артритом в транскриптоме клеток синовиальной оболочки суставов найдено четыре основных фенотипа, каждый из которых отличается уникальным спектром экспрессируемых генов, отражающих количественный и качественный состав активированных резидентных и привлеченных клеток. Обнаруженные фенотипы коррелируют с разным клиническим ответом на терапию моноклональными антителами против ФНО и ИЛ-6 и могут стать важным шагом в направлении персонализированной биологической терапии аутоиммунных заболеваний [36, 37].

Обобщая фармакологические свойства цитокинов как класса лекарственных препаратов, следует признать, что у них есть как безусловные преимущества, так и определенные недостатки. Проблемы применения цитокинов в медицине можно сформулировать следующим образом:

1. Фармакокинетика — короткий период нахождения в циркуляции, составляющий для некоторых препаратов рекомбинантных цитокинов лишь десятки минут. Это не препятствует проявлению цитокинами биологического действия на клетки-мишени, несущие специфические рецепторы, однако ограничивает продолжительность эффектов в организме, делая действие цитокинов импульсным.

2. Побочные эффекты, связанные с плеiotропным механизмом биологического действия.

3. Инъекционные формы, так как цитокины представляют собой полипептиды и не могут быть использованы перорально.

4. Индивидуальные особенности функционирования системы цитокинов. Пожалуй, при клиническом использовании цитокинов как нигде приобретает особую важность развитие персонализированной терапии.

Перечисленные недостатки лекарственных средств на основе молекул рекомбинантных цитокинов послужили основанием для интенсивных экспериментальных исследований, направленных

на поиски решения данных проблем. В связи с этим в последние годы наблюдается активное развитие новых рациональных подходов к клиническому использованию цитокинов. Среди них можно выделить следующие:

1. Разработка пролонгированных лекарственных форм препаратов цитокинов, имеющих улучшенные показатели фармакокинетики, например, препараты пролонгированного пэгилированного ИФНа и Г-КСФ, препараты пролонгированного ЭПО – дарбэпоэтин.

2. Создание лекарственных форм препаратов для местного применения с целью осуществления адресной доставки цитокинов и предотвращения нежелательных побочных эффектов (аэрозоли, мази, гели, капли, биodeградируемые губки, свечи и т.п.).

3. Разработка способов индивидуализированной цитокиновой терапии, основанной на исследовании уровней продукции эндогенных цитокинов и анализе генетических особенностей (в том числе, изучение функционального полиморфизма генов).

4. Генотерапия с помощью введения в клетки костного мозга, тканей суставов или опухолей генов цитокинов с векторами, обеспечивающими достаточный уровень локальной экспрессии целевого белка.

Среди перечисленных подходов наибольшее развитие получило создание новых лекарственных форм для местного применения препаратов цитокинов, особенно разработка мазевых и аэрозольных лекарственных форм. Разработка сухих и жидких аэрозольных форм с заданным размером частиц позволяет создавать условия доставки цитокинов в нужные отделы дыхательной системы. Например, аэрозольный препарат интерферона с большим диаметром частиц будет в основном задерживаться и оседать в области носоглотки, миндалин и трахеи, тогда как мелкодисперсные варианты этого аэрозольного препарата могут проникать более глубоко в легкие. Последний вариант можно использовать и для системного введения цитокинов через легкие, обладающие большой площадью поверхности для всасывания введенных аэрозольно препаратов.

Одним из наиболее перспективных способов клинического применения ИФНа может быть его использование для местного применения при лечении больных острой риновирусной инфекцией и гриппом в эпидемический период. В этом случае может быть реализовано свойство ИФН подавлять размножение любого типа вируса, что очень важно при отсутствии на практике воз-

можности быстро определить, какой тип вируса вызвал конкретную эпидемическую вспышку. В настоящее время препараты ИФНа в виде капель, спрея и аэрозольной формы для местного интраназального применения разработаны и прошли клинические исследования, которые подтвердили их высокую эффективность.

Не менее перспективно создание мазевых форм препаратов цитокинов. Мазевые лекарственные формы обладают целым рядом уникальных свойств, например, способностью создавать депо для постепенного дозированного выхода цитокинов в ткани, меняя фармакокинетику этих лекарств. Развитие данного направления привело к созданию специальных содержащих цитокины мазей, биodeградируемых пленок и раневых покрытий, которые могут быть нанесены непосредственно на раневую поверхность.

Из приведенных данных очевидно, что цитокины как класс биологически активных соединений имеют свои особые иммунофармакологические свойства. Лекарственные препараты на основе цитокинов находят все более широкое применение в клинической практике для лечения широкого круга социально значимых иммунозависимых заболеваний. Разработка и внедрение этих препаратов должны проводиться с учетом целого ряда уникальных свойств, что позволит достичь еще более впечатляющих успехов в клиническом применении препаратов цитокинов и терапевтическом воздействии на систему эндогенных цитокинов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018: 512. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and therapy of human diseases. St. Petersburg: Foliant Publ., 2018: 512 (in Russ.).]
2. Sankaran V.G., Weiss M.J. Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. *Nat. Med.* 2015; 21 (3): 221–230. DOI: 10.1038/nm.3814.
3. Brines M., Cerami A. Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise. *Kidney Int.* 2006; 70 (2): 246–250. DOI: 10.1038/sj.ki.5001546.
4. Lyman G. Pegfilgrastim: a granulocyte colony-stimulating factor with sustained duration of action. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2005; 5 (12): 1635–1646. DOI: 10.1517/14712598.5.12.1635.
5. Schoggins J.W., Rice C.M. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr. Opin. Virol.* 2011; 1 (6): 519–525. DOI: 10.1016/j.coviro.2011.10.008.
6. Molleston J.M., Cherry S. Attacked from All Sides: RNA Decay in Antiviral Defense. *Viruses.* 2017; 9 (1). pii: E2. DOI: 10.3390/v9010002.

7. Martinez J., Huang X., Yang Y. Direct action of type I IFN on NK cells is required for their activation in response to vaccinia viral infection in vivo. *J. Immunol.* 2008; 180 (3): 1592–1597. DOI: 10.4049/jimmunol.180.3.1592.
8. Lindahl P., Gresser I., Leary P., Tovey M. Interferon treatment of mice: enhanced expression of histocompatibility antigens on lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1976; 73 (4): 1284–1287. PMC430248.
9. Welsh R., Bahl K., Marshall H., Urban S. Type 1 interferons and antiviral CD8 T-cell responses. *PLoS Pathog.* 2012; 8 (1): e1002352. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002352. 2012. V.8:e1002352.
10. Srivastava S., Koch M.A., Pepper M., Campbell D.J. Type I interferons directly inhibit regulatory T cells to allow optimal antiviral T cell responses during acute LCMV infection. *J. Exp. Med.* 2014; 211 (5): 961–974. DOI: 10.1084/jem.20131556.
11. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1. Физиология, патология, клиника. СПб.: Фолиант, 2011: 480. [Simbirtsev A.S. Interleukin-1. Physiology, pathology, clinic. St. Petersburg: Foliant Publ., 2011: 480 (in Russ.)].
12. Ng C.T., Oldstone M.B. IL-10: achieving balance during persistent viral infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 380: 129–144. DOI: 10.1007/978-3-662-43492-5_6.
13. Tinoco R., Alcalde V., Yang Y., Sauer K., Zuniga E.I. Cell-intrinsic transforming growth factor- β signaling mediates virus-specific CD8⁺ T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity.* 2009; 31 (1): 145–157. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.06.015.
14. Wang Y., Swiecki M., Cella M., Alber G., Schreiber R.D., Gilfillan S., Colonna M. Timing and magnitude of type I interferon responses by distinct sensors impact CD8 T cell exhaustion and chronic viral infection. *Cell Host Microbe.* 2012; 11 (6): 631–642. DOI: 10.1016/j.chom.2012.05.003.
15. Teijaro J.R. Type I interferons in viral control and immune regulation. *Curr. Opin. Virol.* 2016; 16: 31–40. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.01.001.
16. Dinarello C.A. Biological basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996; 87 (6): 2095–2147. PMID: 8630372
17. Tracey K.J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* 2007; 117 (2): 289–296. DOI: 10.1172/JCI30555.
18. Freitas Lima L.C., Braga V.A., do Socorro de França Silva M., Cruz J.C., Sousa Santos S.H., de Oliveira Monteiro M.M., Balarini C.M. Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. *Front. Physiol.* 2015; 6: 304. DOI: 10.3389/fphys.2015.00304.
19. French M.A., Lenzo N., John N., Mallal S.A., McKinnon E.J., James I.R., Price P., Flexman J.P., Tay-Kearney M.L. Immune restoration disease after the treatment of immunodeficient HIV-infected patients with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med.* 2000; 1 (2): 107–115. PMID: 11737333
20. Norelli M., Camisa B., Barbiera G., Falcone L., Purevdorj A., Genua M., Sanvito F., Ponzoni M., Doglioni C., Cristofori P., Traversari C., Bordignon C., Ciceri F., Ostuni R., Bonini C., Casucci M., Bondanza A. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat. Med.* 2018; 24 (6): 739–748. DOI: 10.1038/s41591-018-0036-4.
21. Boraschi D., Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. *Semin. Immunol.* 2013; 25 (6): 394–407. DOI: 10.1016/j.smim.2013.10.023.
22. Kalliolias G.D., Ivashkiv L.V. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016; 12 (1): 49–62. DOI: 10.1038/nr-rheum.2015.169.
23. Jones S.A., Scheller J., Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J. Clin. Invest.* 2011; 121 (9): 3375–3383. DOI: 10.1172/JCI57158.
24. Rubin L.A., Kurman C.C., Fritz M.E., Biddison W.E., Boutin B., Yarchoan R., Nelson D.L. Soluble interleukin-2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J. Immunol.* 1985; 135 (5): 3172–3177. PMID: 3930598.
25. Wormald S., Hilton D.J. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (2): 821–824. DOI: 10.1074/jbc.R300030200.
26. Hurme M., Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1 β genes. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28 (8): 2598–2602. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199808)28:08<2598::AID-IMMU2598>3.0.CO;2-K.
27. Rudensky A. FoxP3 and dominant tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol.* 2005; 360 (1461): 1645–1646. DOI: 10.1098/rstb.2005.1731.
28. Picard C., Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J.L., Chatila T., Conley M.E., Cunningham-Rundles C., Etzioni A., Holland S.M., Klein C., Nonoyama S., Ochs H.D., Oksenhendler E., Puck J.M., Sullivan K.E., Tang M.L., Franco J.L., Gaspar H.B. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J. Clin. Immunol.* 2015; 35 (8): 696–726. DOI: 10.1007/s10875-015-0201-1.
29. McDermott M., Aksentijevich I., Galon J., McDermott E.M., Ogunkolade B.W., Centola M., Mansfield E., Gadina M., Karenko L., Pettersson T., McCarthy J., Frucht D.M., Aringer M., Torosyan Y., Teppo A.M., Wilson M., Karaarslan H.M., Wan Y., Todd I., Wood G., Schliming R., Kumarajeewa T.R., Cooper S.M., Vella J.P., Amos C.I., Mulley J., Quane K.A., Molloy M.G., Ranki A., Powell R.J., Hitman G.A., O'Shea J.J., Kastner D.L. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell.* 1999; 97 (1): 133–144. PMID: 10199409.
30. Martorana D., Bonatti F., Mozzoni P., Vaglio A., Percesepe A. Monogenic Autoinflammatory Diseases with

- Mendelian Inheritance: Genes, Mutations, and Genotype/Phenotype Correlations. *Front. Immunol.* 2017; 8: 344. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00344.
31. Hoffman H., Mueller J., Broide D., Wanderer A., Kolodner R. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat. Genet.* 2001; 29 (3): 301–305. DOI: 10.1038/ng756.
 32. Aksentijevich I., Masters S.L., Ferguson P.J., Dancey P., Frenkel J., van Royen-Kerkhoff A., Laxer R., Tedger U., Cowen E.W., Pham T.H., Booty M., Estes J.D., Sandler N.G., Plass N., Stone D.L., Turner M.L., Hill S., Butman J.A., Schneider R., Babyn P., El-Shanti H.I., Pope E., Barron K., Bing X., Laurence A., Lee C.C., Chapelle D., Clarke G.I., Ohson K., Nicholson M., Gadina M., Yang B., Korman B.D., Gregersen P.K., van Hagen P.M., Hak A.E., Huizing M., Rahman P., Douek D.C., Remmers E.F., Kastner D.L., Goldbach-Mansky R. An Autoinflammatory Disease with Deficiency of the Interleukin-1 – Receptor Antagonist. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360 (23): 2426–2437. DOI: 10.1056/NEJMoa0807865.
 33. Hawkins P., Lachmann H., Aganna E., McDermott M. Spectrum of clinical features in Muckle-Wells syndrome and response to anakinra. *Arthritis Rheum.* 2004; 50 (2): 607–612. DOI: 10.1002/art.20033.
 34. Crow Y.J. Type I interferonopathies: a novel set of inborn errors of immunity. *Ann. NY Acad. Sci.* 2011; 1238: 91–98. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06220.x.
 35. Aicardi J., Goutières F. A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis. *Ann. Neurol.* 1984; 15 (1): 49–54. DOI: 10.1002/ana.410150109.
 36. Daien C.I., Morel J. Predictive factors of response to biological disease modifying antirheumatic drugs: towards personalized medicine. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 386148. DOI: 10.1155/2014/386148.
 37. 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.J. Synovial phenotypes in rheumatoid arthritis correlate with response to biologic therapeutics. *Arthritis Res. Ther.* 2014; 16 (2): R90. DOI: 10.1186/ar4555.

Сведения об авторе

Симбирцев Андрей Семенович, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, науч. руководитель Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов, г. Санкт-Петербург. ORCID iD 0000-0002-8228-4240.

(✉) Симбирцев Андрей Семенович, e-mail: simbirtsev@hpb-spb.com.

Поступила в редакцию 05.09.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Author information

Simbirtsev Andrey S., Simbirtsev Andrey S., DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Scientific Supervisor, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8228-4240.

(✉) Simbirtsev Andrey S., e-mail: simbirtsev@hpb-spb.com.

Received 05.09.2018
Accepted 17.12.2018

Оценка индикаторов медико-биологического мониторинга йододефицитных заболеваний

Суплотова Л.А.¹, Макарова О.Б.¹, Ковальжина Л.С.², Шарухо Г.В.^{1,3}

¹ Тюменский государственный медицинский университет (ГМУ)
Россия, 625023, г. Тюмень, ул. Одесская, 54

² Тюменский индустриальный университет (ТИИ)
Россия, 625000, г. Тюмень, ул. Володарского, 38

³ Управление федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Тюменской области
Россия, 625026, г. Тюмень, ул. Рижская, 45А

РЕЗЮМЕ

Проблема йодного дефицита остается актуальной во всем мире в связи с широкой распространенностью и негативным влиянием на здоровье человека во все возрастные периоды. Йодный дефицит приводит к снижению интеллектуального потенциала у детей, развитию репродуктивных нарушений в молодом возрасте, а также к формированию многоузлового токсического зоба как крайней точки зубной трансформации, сопровождающейся нарушениями сердечного ритма в среднем и пожилом возрасте. В обзоре освещаются вопросы мониторинга йодного дефицита в регионах, приводятся данные ситуации в мире на этапе становления программ профилактики и в настоящее время. Проведен детальный анализ каждого критерия тяжести йодного дефицита и эффективности профилактических программ. Особое внимание уделено критерию неонатальной гипертиреотропинемии как перспективного индикатора мониторинга йодного дефицита.

Ключевые слова: йодный дефицит, медико-биологический мониторинг, индикаторы, неонатальная гипертиреотропинемия.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Для цитирования: Суплотова Л.А., Макарова О.Б., Ковальжина Л.С., Шарухо Г.В. Оценка индикаторов медико-биологического мониторинга йододефицитных заболеваний. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 96–108. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-96–108](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-96-108).

Assessment of indicators of medical and biological monitoring of iodine deficiency diseases

Suplotova L.A.¹, Makarova O.B.¹, Kovalzhina L.S.², Sharuho G.V.^{1,3}

✉ Суплотова Людмила Александровна, e-mail: suplotoval@mail.ru.

¹ Tyumen State Medical University
54, Odesskaya Str., Tyumen, 625023, Russian Federation

² Industrial University of Tyumen
38, Volodarskogo Str., Tyumen, 625000, Russian Federation

³ Federal Service for Supervision of Consumer Rights and Human Welfare in the Tyumen Region
45A, Righskaya Str., Tyumen 625026, Russian Federation

ABSTRACT

The problem of iodine deficiency remains relevant all over the world due to the widespread prevalence and the negative impact it has on human health in all agegroups. Iodine deficiency leads to a decrease in the intellectual potential of children, the development of reproductive disorders at a young age, as well as the formation of multinodular toxic goiter as the last stage of goiter transformation, accompanied by heart rhythm disturbances in middle and old age. The article covers the issues of monitoring iodine deficiency in the regions of Russia and provides data on the situation in the world on the development of future prevention programs and current prevention programs. A detailed analysis of each criterion for the severity of iodine deficiency and the effectiveness of preventive programs was carried out. Particular attention is paid to the criterion of neonatal hyperthyrotropinemia as a promising indicator for monitoring iodine deficiency.

Key words: iodine deficiency, biomedical monitoring, indicators, neonatal hyperthyrotropinemia..

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

For citation: Suplotova L.A., Makarova O.B., Kovalzhina L.S., Sharuhu G.V. Assessment of indicators of medical and biological monitoring of iodine deficiency diseases. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 96–108. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-96-108>.

ВВЕДЕНИЕ

Хронический дефицит йода приводит к широкому спектру патологии, проявляющейся во все возрастные периоды, которые объединяются термином «йододефицитные заболевания» (ЙДЗ) [1–8]. Помимо заболеваний щитовидной железы (ЩЖ) ЙДЗ включают в себя патологические состояния, обусловленные относительным дефицитом тиреоидных гормонов: нарушение репродуктивной функции, невынашивание беременности, врожденные аномалии и мертворождения, замедление роста и развития детей, а также когнитивные расстройства [1–9]. Однако наибольшую опасность йодный дефицит оказывает на этапе внутриутробного развития ребенка и в раннем детском возрасте в связи с большим значением этого микроэлемента в формировании структур головного мозга и становлении интеллекта [9–15]. К сожалению, изменения, вызванные йодным дефицитом в эти периоды (первые 1 000 дней), приводят к необратимым дефектам в интеллектуальном развитии детей и в самых тяжелых случаях – к кретинизму [16]. Наличие даже легкого йодного дефицита в регионе приводит к снижению интеллекта, рас-

стройствам психического здоровья и ослаблению физического развития детей [5–7, 9–15].

Так, в работе N. Bleichrodt и соавт. [17] было впервые показано снижение когнитивных функций у населения йододефицитных районов. В дальнейшем многочисленные исследования подтвердили негативное влияние йодного дефицита на показатели интеллектуального развития. Уровень IQ (intelligence quotient, коэффициент интеллекта) в среднем на 8–18% ниже у жителей йододефицитных территорий [18–20]. Пренатальный дефицит йода приводит к снижению памяти (до 46%), внимания, мышления и нарушению речи у детей; влияет на психические функции. У 80% детей развивается эмоциональная неустойчивость, отмечаются трудности в общении, характерна агрессивность [16–20]. В большинстве регионов России выявлена пограничная степень интеллектуальной недостаточности, уровень IQ школьников ниже нормального интеллектуального развития на 11–18% [21]. В настоящее время на первый план выходят субклинические нарушения интеллектуального развития популяции в условиях сохраняющегося йодного дефицита [22].

Йодный дефицит (ЙД) является основной зубной трансформации, запускающей процессы гипертрофии и гиперплазии тиреоцитов, приводящей к узлообразованию и при длительном течении – к формированию функциональной автономии с развитием манифестного тиреотоксикоза. В йододефицитных регионах функциональная автономия является основной и клинически наиболее значимой причиной тиреотоксикоза в пожилом возрасте [23]. Результаты крупных популяционных исследований свидетельствуют о значительном смещении пика заболеваемости тиреотоксикозом в старшую возрастную группу за счет высокой заболеваемости многоузловым токсическим зобом с формированием функциональной автономии [24–26]. Клиническими особенностями тиреотоксикоза при этом являются моно- или олигосимптомное течение с преимущественным поражением сердечно-сосудистой системы с манифестацией нарушений ритма (фибрилляция предсердий (ФП)) – 75% [23, 24, 27, 28]. В свою очередь, в структуре причин ФП тиреотоксикоз занимает 5–63% в зависимости от возраста и региона проживания пациента [29–31]. Исследования демонстрируют увеличение частоты ФП с возрастом, а также в работе Е. Сердеч-

ной и соавт. [32] показан существенный рост распространенности и частоты ФП за 25-летний период на Северо-Западе России.

В то же время в странах с адекватным йодным обеспечением пик тиреотоксикоза приходится на молодой возраст (30–40 лет), обусловленный болезнью Грейвса, а частота новых случаев тиреотоксикоза не повышается с возрастом [24–26]. Таким образом, высокая распространенность ФП, в том числе в результате тиреотоксикоза в когорте пожилых лиц, необходимость радикального лечения многоузлового токсического зоба представляют серьезную медико-социальную проблему, которую можно предупредить внедрением и реализацией программ профилактики ЙД. Мониторинг тяжести ЙД в регионах позволяет как оценивать эффективность проводимых профилактических мероприятий, так и корректировать их.

БОРЬБА С ЙОДНЫМ ДЕФИЦИТОМ В МИРЕ

Эпидемиологическими исследованиями 1990-х гг. была показана масштабность проблемы – более 110 стран мира находились в условиях йодного дефицита различной степени тяжести (рис. 1) [1–5, 22, 33].



Рис. 1. Глобальная карта тяжести йодного дефицита, 1993 (IGN, Iodine Global Network)

Fig. 1. The global map of iodine deficiency for 1993 (IGN, Iodine Global Network)

Актуальность и высокая распространенность йодного дефицита нашли отражение в деятельности международных организаций: Организации Объединенных Наций (ООН), ЮНИСЕФ (United Nations International Children's Emergency Fund — международная организация, действующая под эгидой ООН), Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), Международного совета по кон-

тролю за йододефицитными заболеваниями, которые обозначили вопрос профилактики ЙД как одно из приоритетных направлений здравоохранения во всем мире [22, 33, 34]. Международная группа по развитию детей определила дефицит йода как один из четырех ключевых глобальных факторов риска ненормального развития ребенка, где потребность вмешательства является сроч-

ной [35]. В 1990 г. была подписана Конвенция о правах ребенка, в которой декларировано право ребенка «на обеспечение достаточным количеством йода, гарантирующим его нормальное развитие» (Конвенция о правах ребенка. Всемирная встреча в интересах детей, Нью-Йорк, 1990).

В 1994 г. принято соглашение ООН, ЮНИСЕФ и ВОЗ о предпочтительной стратегии ликвидации ЙДЗ и необходимости внедрения всеобщего йодирования соли (ВЙС) [22]. В соответствии с системой ВЙС, вся пищевая соль, используемая в домохозяйствах и пищевой промышленности, должна быть обогащена йодом как наилучший метод профилактики ЙДЗ. Выбор соли в качестве «немного носителя йода» обусловлен широким использованием этого продукта в питании в мире всеми слоями населения независимо от достатка, времени года. Йодированная соль не меняет органолептические свойства продуктов, обладает высокой биодоступностью, не имеет медицинских противопоказаний к использованию, передозировка исключена. Кроме того, технологии обогащения соли йодом и контроль качества от-

работаны, дозировка проста, а также такая профилактика является экономически выгодной и доступной (добавочная стоимость йодирования 1 кг соли составляет около 2 руб.) [36–40]. В здравоохранении не существует более экономически эффективной программы профилактики распространенных неинфекционных заболеваний. В последующем международный опыт показал, что принятие ВЙС на законодательном уровне является наиболее эффективным способом решения проблемы йодного дефицита [36–41].

Несмотря на всю простоту профилактики йодного дефицита, на очевидные успехи в его ликвидации, проблема остается актуальной до настоящего времени. Если в 1993 г. в мире 113 стран были признаны йододефицитными, то, благодаря внедрению профилактических программ на государственном уровне по обязательному йодированию соли, к 2017 г. в большинстве из них проблема дефицита йода решена. Однако до настоящего времени в 19 странах, в числе которых Россия и Украина, вопрос недостаточного потребления йода остается актуальным (рис. 2, 3).



Рис. 2. Структура йодного дефицита в мире, 1993–2016 (ICCIDD, 2017)

Fig. 2. Global status of iodine deficiency, 1993–2016 (ICCIDD, 2017)

И это при том, что наша страна имеет уникальный исторический опыт ликвидации йодного дефицита, контроль над которым был утрачен с 1990-х гг. (большинство территорий России являются йододефицитными) [39, 41–43]. В 1999 г. были приняты Постановление правительства № 1119 от 5 октября «О мерах по профилактике заболеваний, связанных с дефицитом йода», Постановление Главного государственного санитарного врача РФ № 14 от 23 ноября «О мерах по профилактике заболеваний, обусловленных дефицитом йода и других микронутриентов» и Приказ Минздрава России № 444 от 14 дека-

бря «О мерах по профилактике заболеваний, связанных с дефицитом йода и других микронутриентов». Таким образом, перечисленные законодательные документы, представляющие до настоящего времени всю нормативную базу для йодирования соли в России [39], устанавливают на практике добровольную модель профилактики ЙДЗ путем использования йодированной соли и других обогащенных йодом продуктов. А международный опыт свидетельствует об эффективности принятия закона о ВЙС для решения проблемы йодного дефицита (см. рис. 2). В Российской Федерации такого закона нет.

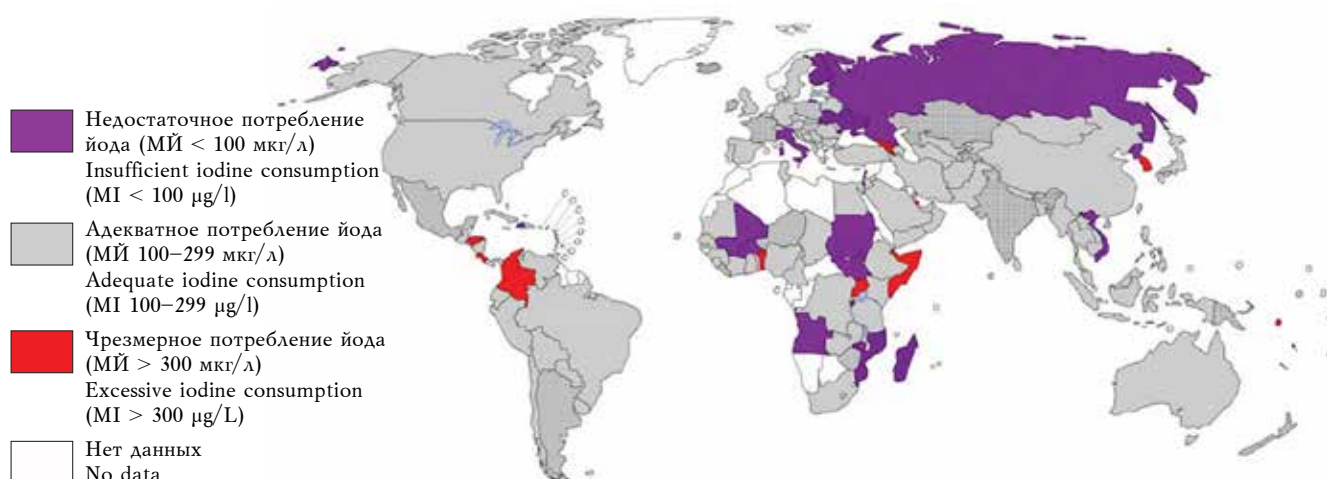


Рис. 3. Глобальная карта йодного потребления у детей препубертатного возраста, 2017 (IGN, Iodine Global Network)

Fig. 3. Global map of iodine consumption according to median iodine (MI) in pre-pubertal children, 2017 (IGN, Iodine Global Network)

По данным многочисленных эпидемиологических исследований, в нашей стране сохраняется проблема йодного дефицита, несмотря на попытки решения вопроса «на местах», используя региональные программы профилактики в отсутствие закона о ВИС. Более 60% населения страны проживают в регионах с природно обусловленным йодным дефицитом. Несмотря на реализацию профилактических программ (мероприятий) в регионах, существующая «добровольная» модель профилактики доказала свою неэффективность [43–46]. Фактическое среднее потребление йода жителями нашей страны составляет 40–80 мкг/сут, что в 2–3 раза меньше установленной ВОЗ нормы потребления (150–250 мкг/сут), а йодированную соль в питании регулярно употребляют менее 30% населения [39, 45, 46].

На карте Iodine Global Network (см. рис. 2) отражена положительная динамика йодного обеспечения стран мира по сравнению с 1993 г. (см. рис. 1). Однако по-прежнему самая большая по территории страна сохраняет недостаточное потребление йода наряду со странами Африки, Афганистаном и некоторыми другими [http://www.ign.org/cm_data/IGN_Global_Map_AllPop_30May2017.pdf].

Программы по йодированию соли, как и любые другие профилактические мероприятия, требуют создания эффективной системы мониторинга и оценки. Проблема заключается в том, чтобы применить показатели ЙДЗ, используя для этого верные и надежные методы с минимальными затратами. Особую актуальность это приобретает в

свете принятия глобального плана действий ВОЗ по профилактике неинфекционных заболеваний и борьбе с ними на 2013–2020 гг. (Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases, 2013–2020) [47]. Одной из глобальных целей ВОЗ провозглашено сокращение на треть среднего потребления населением соли с поправкой: при необходимости скорректировать содержание йода в йодированной соли. То есть соль должна быть йодирована априори, вопрос только в концентрации йода на единицу продукта, для обеспечения суточной потребности в этом микроэлементе с учетом потерь на этапах хранения и приготовления пищи.

В ноябре 2014 г. был опубликован очередной документ ВОЗ «Обогащение пищевой соли йодом для профилактики заболеваний, вызванных дефицитом йода» [36, 37], регламентирующий все аспекты йодирования соли. В соответствии с глобальной стратегией ВОЗ по профилактике неинфекционных заболеваний, были опубликованы новые рекомендации по концентрации йода при обогащении пищевой соли, которая может регулироваться в зависимости от норм потребления соли и суточной потребности в йоде с учетом потерь во время хранения и кулинарной обработки. В рекомендациях сделан акцент на необходимости проведения постоянного мониторинга содержания йода в соли и экскреции йода с мочой (табл. 1) для получения своевременной информации о недостатке или избытке потребления этого микронутриента, что позволит внести коррективы в нормативы содержания йода в соли [38].

Т а б л и ц а 1
T a b l e 1

Эффективность профилактики йододефицитных заболеваний (ВОЗ, ЮНИСЕФ, МСКИДЗ, 2001, 2007, 2014) Criteria for assessing the effectiveness of iodine deficiency disorders (WHO, UNISEF, ICCIDD, 2001, 2007, 2014)	
Индикатор Indicator	Целевой показатель Goal
Йодирование соли Iodization of salt Доля домашних хозяйств, употребляющих качественную йодированную соль, % Share of households using quality iodized salt, %	> 90
Концентрация йода в моче, мкг/л Concentration of iodine in the urine, mkg/l Медиана йодурии в общей популяции Median ioduria in the general population Медиана йодурии у беременных женщин Median ioduria in pregnant women	100–199 50–249

В 1994 г. для оценки тяжести йодного дефицита ВОЗ совместно с ЮНИСЕФ и Международным комитетом по контролю за йододефицитными заболеваниями (МСКИДЗ) приняли «Показатели для оценки йододефицитных заболеваний и их профилактики путем йодирования соли», в котором даны рекомендации по использованию инди-

каторов для контроля за ЙДЗ (табл. 2) [5, 22, 33]. Согласно определению, индикаторами являются показатели, позволяющие отслеживать воздействие проводимых профилактических мероприятий для устранения йодного дефицита и также оценивать распространенность ЙДЗ как одной из проблем общественного здоровья [22, 48–55].

Т а б л и ц а 2
T a b l e 2

Тяжесть йодного дефицита (ВОЗ, 1994) Epidemiological criteria for assessing the severity of iodine deficiency disorders (WHO, 1994)				
Индикатор Indicator	Референтная популяция Population Group	Степень тяжести йодного дефицита Iodine deficiency		
		Легкая Mild	Умеренная Moderate	Тяжелая Severe
Медиана йодурии, мкг/л Median urinary iodine, µg/l	ДПВ* School-age children	50–99	20–49	< 20
Зоб (увеличение щитовидной железы >0-й степени), % Prevalence of goiter (palpation), %	ДПВ School-age children	5–19,9	20–29,9	≥ 30
Тиромегалия (объем >97-го перцентиля), % Prevalence of goiter (ultrasound), %	ДПВ School-age children	5–19,9	20–29,9	≥ 30
Тиреотропный гормон цельной крови >5 мкМЕ/л, %	Новорожденные Newborns	3–19,9	20–39,9	≥ 40

* ДПВ – дети пубертатного возраста.

ОЦЕНКА ПОТРЕБЛЕНИЯ ЙОДА НАСЕЛЕНИЕМ

В качестве «золотого стандарта» мониторинга тяжести йодного дефицита, а также эффективности профилактических программ является определение экскреции йода с мочой, которое отражает количество недавнего поступления йода с пищей [5, 22, 33, 55–61]. Исследования убедительно показывают адекватность оценки потребления йода населением при изучении содержания йода в утренней или разовой порции мочи. Значения йодурии в популяции имеет неправильное рас-

пределение, поэтому для оценки используют показатели медианы, а не среднее арифметическое. Также при оценке разброса значений рекомендовано использовать перцентильный анализ, а не стандартные отклонения. Медиана йодурии (МЙ) более 100 мкг/л указывает на то, что население не имеет дефицита йода, при этом не менее 50% образцов мочи должны иметь показатель выше 100 мкг/л. Кроме того, не более 20% образцов мочи должны иметь показатель ниже 50 мкг/л [55–61]. Медиана йодурии является чувствительным маркером недавнего потребления йода (за 24–48 ч) и отражает эпидемиологическую ситуа-

цию в популяции, поэтому ее используют как для определения тяжести йодного дефицита в регионе, а также для контроля программ профилактики наряду с определением доли домохозяйств, использующих йодированную соль. На основании данных МЙ формируется глобальная карта йодного потребления (IGN, Iodine Global Network). Однако, несмотря на все плюсы данного метода, в России в настоящее время существует проблема определения йода в моче в связи с отсутствием лабораторий, выполняющих данный вид исследований. Поскольку использование показателя МЙ в нашей стране пока невозможно, вопрос выбора надежного индикатора оценки йодного дефицита и эффективности программ профилактики стоит очень остро.

ЧАСТОТА ЗОБА В ПОПУЛЯЦИИ

Одним из самых простых индикаторов тяжести ЙД является определение частоты зоба в популяции [55–58]. Наиболее репрезентативной группой для обследования являются дети школьного возраста (6–12 лет), отличающиеся высокой уязвимостью и увеличением щитовидной железы в ответ на дефицит йода. Осмотр и пальпация щитовидной железы являются традиционными способами определения ее размеров, которые сопоставляются с длиной дистальной фаланги большого пальца обследуемого и оцениваются по классификации ВОЗ [55, 56].

Показатель частоты зоба 5% и выше свидетельствует о проблеме йодного дефицита территории. По уровню частоты также определяется степень тяжести зобной эндемии: 5–19,9% – слабая, 20–29,9% – умеренная, выше 30% – тяжелая [22, 55–62]. Классификация по степени тяжести ЙДЗ (слабая, умеренная и тяжелая) является относительной, результаты должны интерпретироваться с учетом данных, полученных при анализе других показателей. Размеры щитовидной железы изменяются обратно пропорционально величине потребления йода с запозданием от нескольких месяцев до нескольких лет. После внедрения профилактических программ показатели частоты зоба меняются через 8–10 лет, однако количество новых случаев зоба уже значительно меньше через 1–2 года после начала профилактики. Положительными характеристиками критерия является: высокая доступность, неинвазивность, простое обучение персонала и невысокая стоимость. Однако пальпация является субъективным методом, вызывающим разногласия даже у опытных врачей, обладает низкой специфичностью и чувствительностью.

Более точным и объективным методом определения объема щитовидной железы является ультразвуковое исследование. И, несмотря на принятые ВОЗ (2007) нормативы оценки объема щитовидной железы в детской популяции, до настоящего времени ведутся дискуссии на эту тему [63].

Оценка эффективности проводимых профилактических мероприятий по устранению ЙД может рассматриваться на основании эпидемиологических показателей ЙДЗ среди населения. В работе Е.А. Трошиной и соавт. (2018) проведен анализ динамики распространенности йододефицитных заболеваний у детей, подростков и взрослых, показавший сохраняющуюся проблему йодного дефицита на территории РФ [53]. Однако в статье использованы данные официальной статистики (статистические данные по форме № 63 «Сведения о заболеваниях, связанных с микронутриентной недостаточностью», утвержденной Постановлением Госкомстата России № 28 от 29.03.2000), которые по точности уступают научным исследованиям. По данным исследований репрезентативных групп, фактическая распространенность эндемического зоба превышает регистрируемую в 10 раз [51]. В связи с этим возникает вопрос о надежных индикаторах ЙД.

ТИРЕОГЛОБУЛИН И ТИРЕОТРОПНЫЙ ГОРМОН – МАРКЕРЫ ЙОДОДЕФИЦИТА

Определение уровня тиреоглобулина (ТГ) и тиреотропного гормона (ТТГ) может быть использовано в качестве показателя ЙД [55–58]. Измерение концентрации тиреоидных гормонов (тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3)) нецелесообразно для проведения мониторинга ЙДЗ в связи с большим вариабельностью значений (на фоне ЙД содержание Т4 ниже, а уровень Т3 выше, чем в популяции). Из-за жесткой гомеостатической регуляции уровень этих гормонов может оставаться в пределах референсного интервала у лиц с низким потреблением йода [55–58].

В последнее время в литературе широко обсуждается возможность применения ТГ в качестве маркера ЙД [64–67]. Тиреоглобулин является основным белком щитовидной железы, создающим матрицу для синтеза тиреоидных гормонов. При дефиците йода высокая концентрация ТГ обусловлена стимулирующим влиянием ТТГ на щитовидную железу, что приводит к ее увеличению [65]. Таким образом, концентрация ТГ в сыворотке крови отражает объем щитовидной железы. В 1994 г. ВОЗ и ЮНИСЕФ признали возможность использования ТГ в качестве индикатора йодно-

го статуса школьников и предложили пороговое значение ТГ менее 10 мкг/л как соответствующее адекватному йодному потреблению [22, 55, 58, 68]. ТГ рассматривается в качестве перспективного биомаркера йодного статуса школьников, поскольку он лучше демонстрирует долгосрочное потребление йода, и по его концентрации можно судить как о дефиците йода, так и о чрезмерном его потреблении [58, 65]. Ряд исследований [69] показали положительную корреляцию ТГ с другими показателями йододефицита. Уровень ТГ отрицательно коррелирует с йодурией и повышен у детей с выраженной йодной недостаточностью [47, 48]. Однако есть определенные сложности в определении ТГ.

Вариабельность результатов при исследовании стандартного образца различными лабораторными методами может достигать 43–65%, а после стандартизации – 30%. Вторая проблема – наличие антител к ТГ, которые встречаются у 3–13% взрослого населения. Однако у детей антитела к ТГ не выявляются. С.И. Исмаилов и соавт. (2017) не рекомендуют использовать ТГ как самостоятельный маркер йодной недостаточности в регионе, в котором большая часть детей имеет дефицит йода [69]. В то же время определение содержания ТГ необходимо для оценки эффективности профилактических программ и позволит скорректировать концентрацию йода в соли [70].

Что касается ТТГ, концентрация ТТГ выше у населения, подверженного йодному дефициту, нежели у лиц с адекватным йодным обеспечением [4–6, 22, 55, 68, 69]. Тем не менее в эпидемиологических исследованиях использование ТТГ у школьников и взрослых не рекомендуется в связи с высокой вариабельностью показателей гормона в этих когортах. В то же время содержание ТТГ у новорожденных в большей степени зависит от йода в связи с высокой интенсивностью обмена веществ [71]. Таким образом, большое количество новорожденных с повышенным уровнем ТТГ является свидетельством наличия йодного дефицита в популяции.

НЕОНАТАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ВРОЖДЕННОГО ГИПОТИРЕОЗА

Во многих развитых странах проводится неонатальный скрининг, целью которого является ранняя диагностика врожденного гипотиреоза (ВГ), а возможность проведения анализа ТТГ с чувствительностью 5 мкМЕ/л позволяет выявлять небольшие изменения этого показателя относительно нормы (транзиторная гипертиреотропиемия). Увеличение числа новорожденных с

умеренным увеличением содержания ТТГ (выше 5 мкМЕ/л в цельной крови) пропорционально степени выраженности йодного дефицита. В регионах с тяжелым недостатком йода этот показатель может превышать 40%. Согласно рекомендациям ВОЗ (1994), для территорий с благополучным йодным обеспечением уровень неонатального ТТГ выше 5 мкМЕ/л определяется не более чем у 3% новорожденных [22, 55]. В регионах с легким йодным дефицитом этот показатель составляет 3–19,9%, с умеренным – 20–39,9%, более 40% – с тяжелым ЙД [4–6, 22, 55, 68, 69]. Целью скрининга является ранняя диагностика врожденного гипотиреоза, а использование для оценки выраженности йодного дефицита – «дополнительным бонусом». Частота неонатальной гипертиреотропиемии выше 5 мМЕ/л имеет обратную корреляцию с медианой йодурии в регионах с умеренным и тяжелым ЙД. В странах с пограничным и легким ЙД данные носят противоречивый характер и не всегда сопровождаются изменением уровня неонатального (н) ТТГ [71–75]. Положительным моментом данного критерия является полный охват скринингом ВГ всех новорожденных. Кроме того, использование данных нТТГ, который определяется в рамках данной программы, не требует дополнительных финансовых затрат.

Для большинства стран мира, в которых реализуются национальные программы ВИС, уровень нТТГ является актуальным индикатором, так как вся популяция, равно как и беременные женщины, находятся в одинаковых условиях по потреблению йода. Для Российской Федерации и стран, где нет государственного регулирования (нет закона о ВИС, нет законодательной базы для всеобщего обязательного йодирования соли и эффективных механизмов правоприменения) и существует индивидуальная и групповая профилактика среди беременных (стандарт по ведению беременных – приказ 1.11.12 № 572н), предполагающая использование лекарственных препаратов йода в физиологической дозе в течение всего гестационного периода, встает вопрос объективности критерия неонатальной гипертиреотропиемии выше 5 мкМЕ/л как индикатора тяжести ЙД на территории.

В нашем исследовании [76] в популяции детей препубертатного возраста проведен корреляционный анализ между частотой встречаемости йододефицитного зоба и нТТГ в концентрации выше 5 мкМЕ/л. Он показал сильную положительную связь ($r = 0,94$; $p < 0,05$), что характеризует уровень нТТГ как надежный маркер ЙД и степени его тяжести в регионе. Кроме того,

в руководстве для менеджеров программ профилактики ИД (ВОЗ, 2001) указано, что в странах, где внедрена система неонатального скрининга врожденного гипотиреоза с определением ТТГ, дополнительных обследований не требуется [77].

Таким образом, в отсутствии экономической возможности измерения йодурии выявление неонатальной гипертиреотропинемии могло бы быть надежным индикатором йододефицита в России.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Герасимов Г.А., Фадеев В.В., Свириденко Н.Ю., Мельниченко Г.А., Дедов И.И. Йоддефицитные заболевания в России. Простое решение сложной проблемы. М.: Адамант, 2002: 168. [Gerasimov G.A., Fadeev V.V., Sviridenko N.Ju., Mel'nichenko G.A., Dedov I.I. Iodine deficiency disorders in Russia. A simple solution to a complex problem. Moscow: Adamant Publ., 2002: 168 (in Russ.)].
- Платонова Н.М. Йодный дефицит: современное состояние проблемы. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2015; 11 (1): 12–21. [Platonova N.M. Iodine deficiency: the current state of the problem. *Clinical and Experimental Thyroidology*. 2015; 11 (1): 12–21 (in Russ.)]. DOI: 10.14341/ket2015112-21.
- UNICEF. World declaration on the survival, protection and development of children the World Summit for Children. New York: UNICEF, 1990.
- World Health Organization. Overcoming iodine deficiency disorders. Geneva (Switzerland): WHO, 1990.
- World Health Organization/UNICEF/International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders. Global prevalence of iodine deficiency disorders. Micronutrient Deficiency Information System Working Paper No. 1. Geneva: WHO, 1993.
- Zimmermann M.B., Jooste P.L., Pandav C.S. Iodine deficiency disorders. *Lancet*. 2008; 372 (9645): 1251–1262. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61005-3.
- Zimmermann M.B. Iodine deficiency. *Endocr. Rev.* 2009; 30: 376–408. DOI: 10.1210/er.2009-0011.
- Zimmermann M.B., Andersson M. Assessment of iodine nutrition in populations: past, present, and future. *Nutr. Rev.* 2012; 70: 553–70. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2012.00528.x
- Трошина Е.А., Платонова Н.М., Соловьева С.И., Абдулхабирова Ф.М. Интеллектуальное развитие школьников с диффузным клинически эутиреоидным зобом в регионах с различной йодной обеспеченностью. *Педиатрическая фармакология*. 2009; 6 (2): 43–48. [Troshina E.A., Platonova N.M., Solov'eva S.I., Abdulhabirova F.M. Intellectual development of school children with diffuse clinically euthyroid goiter in regions with different iodine security. *Pediatric Pharmacology*. 2009; 6 (2): 43–48 (in Russ.)].
- Щеплягина Л.А., Макулова Н.Д., Маслова О.И. Научный центр здоровья детей РАМН, Москва. Состояние когнитивной сферы у детей в районах с дефицитом йода. *Consilium Medicum*. 2001; 08. [Shhepljagina L.A., Makulova N.D., Maslova O.I. Scientific Center of Children's Health, RAMS, Moscow. The state of the cognitive sphere in children in areas with iodine deficiency. *Consilium Medicum*. 2001; 08 (in Russ.)].
- Angela M. Leung, Gregory A. Children of mothers with iodine deficiency during pregnancy are more likely to have lower verbal IQ and reading scores at 8–9 years of age. *Evidence-based Nursing*. 2014; 17 (3): 86. DOI: 10.1136/eb-2013-101585.
- Delange F. Iodine deficiency as a cause of brain damage. *Postgraduate Medical Journal*. 2001; 77 (906): 217–220. DOI: 10.1136/pmj.77.906.217.
- Delange F. The role of iodine in brain development. *Proc. Nutr. Soc.* 2000; 59 (1): 75–79. DOI: 10.1017/S0029665100000094.
- Ming Qian, Dong Wang B.A., William E. Watkins, Val Gebiski, Yu Qin Yan, Mu Li, Zu Pei Chen. The effects of iodine on intelligence in children: a metaanalysis of studies conducted in China. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2005; 14 (1): 32–42.
- Leung A.M., Brent G.A. Children of mothers with iodine deficiency during pregnancy are more likely to have lower verbal IQ and reading scores at 8–9 years of age. *Evidence-based Nursing*. 2014; 17 (3): 86. DOI: 10.1136/eb-2013-101585.
- Velasco I., Bath S.C., Rayman M.P. Iodine as Essential Nutrient during the First 1000 Days of Life. *Nutrients*. 2018 Mar 1; 10 (3). pii: E290. DOI: 10.3390/nu10030290.
- Bleichrodt N., P.J.D. Drenth, Querido A. Effects of iodine deficiency on mental and psychomotor abilities. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1980; (53): 55–67. DOI: 10.1002/ajpa.1330530110.
- Щеплягина Л. А., Макулова Н.Д. Йод и интеллектуальное развитие ребенка. *Русский медицинский журнал*. 2002; (7). 358–363. [Shhepljagina L. A., Makulova N.D. Iodine and intellectual development of the child. *Russian Medical Journal*. 2002; (7): 358–363 (in Russ.)].
- Щеплягина Л. А., Римарчук Г.В., Васечкина Л.И. Препараты йода в коррекции когнитивных нарушений у детей М.: МедЭкспертПресс, 2008: 230. [Shhepljagina L. A., Rimarchuk G.V., Vasechkina L.I. Iodine preparations in correction of cognitive impairment in children. М.: MedJekspertPress Publ., 2008: 230 (in Russ.)].
- Федак И.Р. Контрольно-эпидемиологические исследования эффективности региональных программ профилактики йоддефицитных заболеваний в РФ: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2008: 30. [Fedak I. R. Control and epidemiological studies of the effectiveness of regional programs for the prevention of iodine deficiency disorders in the Russian Federation. Moscow, 2008: 30 (in Russ.)].
- Moleti M., Sturniolo G., Trimarchi F., Vermiglio F. The changing phenotype of iodine deficiency disorders: a review of thirty-five years of research in north-eastern Sic-

- ily. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 2016; 52 (4): 550–557. DOI: 10.4415/ANN_16_04_15.
22. World Health Organization. Indicators for Assessing Iodine Deficiency Disorders and Their Control Through Salt Iodination. Geneva, 1994.
 23. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Фадеев В.В. Эндокринология: учебник для вузов 3-е изд., переработанное и дополненное. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2015: 416. [Dedov I.I., Mel'nichenko G.A., Fadeev V.V. Endocrinology. M.: GEOTAR-Media Publ., 2015: 416 (in Russ.)].
 24. Фадеев В.В. Заболевания щитовидной железы в регионе легкого йодного дефицита: эпидемиология, диагностика, лечение. М.: Издательский дом Видар-М, 2005: 240. [Fadeev V.V. Thyroid gland diseases in the region of mild iodine deficiency: epidemiology, diagnosis, treatment. M.: Publishing House Vidar-M Publ., 2005: 240 (in Russ.)].
 25. Laurberg P., Pedersen K.M., Vestergaard H., Sigurdsson G. High incidence of multinodular toxic goiter in the elderly population in a low iodine intake area vs high incidence of Graves' disease in the young in a high iodine intake area: comparative surveys of thyrotoxicosis epidemiology in East-Jutland Denmark and Iceland. *J. Intern. Med.* 1991; 229 (5): 415–420. DOI: 10.1111/j.1365-2796.1991.tb00368.x.
 26. Laurberg P., Pedersen K.M., Hreidarsson A., Sigfusson N., Iversen E., Knudsen P.R. Iodine intake and the pattern of thyroid disorders: a comparative epidemiological study of thyroid abnormalities in the elderly in Iceland and in Jutland, Denmark. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83 (3): 765–769. DOI: 10.1210/jcem.83.3.4624.
 27. Кравцова Т.Ю., Заривчацкий М.Ф., Блинов С.А., Денисов С.А., Теплых Н.С., Каменских Е.Д., Мугатаров И.Н., Колыванова М.В. Тактические подходы ведения пациентов пожилого и старческого возраста с тиреотоксикозом в амбулаторной практике хирурга и терапевта. *Таврический медико-биологический вестник.* 2017; 20 (3): 140–145. [Kravtsova T.Yu., Zarivchatskiy M.F., Blinov S.A., Denisov S.A., Teplykh N.S., Kamenskikh E.D., Mugatarov I.N., Kolyvanova M.V. Tactical approaches for the management of elderly and senile patients with thyrotoxicosis in an outpatient practice of surgeons and therapists. *Tavricheskiy Mediko-Biologicheskii Vestnik.* 2017; 20 (3): 140–145 (in Russ.)].
 28. Марусенко И.М., Петрова Е.Г. Тиреотоксикоз и фибрилляция предсердий. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии.* 2017; 13 (3): 398–402. [Marusenko I.M., Petrova E.G. Hyperthyroidism and atrial fibrillation. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology.* 2017; 13 (3): 398–402 (in Russ.)]. DOI: 10.20996/1819-6446-2017-13-3-398-402.
 29. Бугова Л.А., Кондратьева Л.А., Аметов А.С. Болезнь Грейвса и функциональная автономия щитовидной железы в регионе с легким йодным дефицитом. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология.* 2011; 7 (4): 51–55. [Bugova L.A., Kondratieva L.A., Ametov A.S. Graves' disease and thyroid functional autonomy in the region of mild iodine deficiency. *Clinical and Experimental Thyroidology.* 2011; 7 (4): 51–55 (in Russ.)]. DOI: 10.14341/ket20117451-55.
 30. Тавровская Т.В., Моргунова Т.Б., Тимофеев А.В., Берестенникова Л.Н. Фибрилляция предсердий и тиреотоксикоз. *Вестник аритмологии.* 2009; 56: 59–80. [Tavrovskaya T.V., Morgunova T.B., Timofeyev A.V., Berestennikova L.N. Atrial fibrillation and thyrotoxicosis. *Journal of Arrhythmology.* 2009; 56: 59–80 (in Russ.)].
 31. Васильева А.Г., Кондрашкина О.В., Ардашев В.Н., Стеблецов С.В. Вариабельность сердечного ритма при тиреотоксикозе. *Кремлевская медицина. Клинический вестник.* 2018; 1: 165–180. [Vasil'yeva A.G., Kondrashkina O.V., Ardashev V.N., Stebletsov S.V. Heart rate variability in patients with thyrotoxicosis. *Kremlin Medicine Journal.* 2018; 1: 165–180 (in Russ.)].
 32. Сердечная Е., Татарский Б., Казакевич Е. Частота и распространенность фибрилляции предсердий. *Врач.* 2008; 7: 78–79. [Serdechnaya E., Tatarskiy B., Kazakevich E. Frequency and prevalence of atrial fibrillation. *Vrach (The Doctor).* 2008; 7: 78–79 (in Russ.)].
 33. Indicators for Assessing Iodine Deficiency Disorders and their Control Programmes. Report of a joint WHO/UNICEF/ICCIDD Consultations. 1993.
 34. World Health Organization: Salt Reduction and Iodine Fortification Strategies in Public Health. Geneva, 2014.
 35. Walker S.P., Wachs T.D., Gardner J.M., Lozoff B., Wasserman G.A., Pollitt E., Carter J.A. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *Lancet.* 2007; 369: 145–157. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60076-2.
 36. WHO. Guideline: fortification of food-grade salt with iodine for the prevention and control of iodine deficiency disorders. Geneva: World Health Organization, 2014.
 37. WHO. Salt reduction and iodine fortification strategies in public health: report of a joint technical meeting convened by the World Health Organization and The George Institute for Global Health in collaboration with the International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders Global Network. Sydney: World Health Organization, 2013.
 38. Герасимов Г.А. О рекомендациях ВОЗ «Обогащение пищевой соли йодом для профилактики заболеваний, вызванных дефицитом йода». *Клиническая и экспериментальная тиреоидология.* 2014; 10 (4): 5–8. [Gerasimov G.A. On WHO Guidelines "Fortification of food grade salt". *Clinical and Experimental Thyroidology.* 2014; 10 (4): 5–8 (in Russ.)]. DOI: 10.14341/ket201445-8.
 39. Справка о распространенности, результативности профилактических мер и последствиях йододефицитных заболеваний в Российской Федерации / ФГБУ «ЭНЦ» Г.А. Мельниченко. [Information on the prevalence, effectiveness of preventive measures and the consequences of iodine deficiency diseases in the

- Russian Federation. Federal state budgetary institution "National Medical Research Center of Endocrinology" G.A. Melnichenko, Ministry of Health of the Russian Federation. (in Russ.)]
40. Møllehave L.T., Linneberg A., Skaaby T., Knudsen N., Ehlers L., Jørgensen T., Thuesen B.H. Trends in Costs of thyroid disease treatment in denmark during 1995–2015. *Eur. Thyroid. J.* 2018; 7 (2): 75–83. DOI: 10.1159/000485973. Epub 2018 Jan 10.
41. Герасимов Г.А., van der Haar F., Lazarus J.H. Обзор возможных стратегий профилактики йодного дефицита в странах Юго-Восточной Европы и Центральной Азии: 2009–2016. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология.* 2017; 13 (4): 16–22. [Gerasimov G.A., van der Haar F., Lazarus J.H. A review of possible strategies for preventing iodine deficiency in the countries of South-Eastern Europe and Central Asia: 2009–2016. *Clinical and Experimental Thyroidology.* 2017; 13 (4): 16–22 (in Russ.)]. DOI: 10.14341/ket9531.
42. Исмаилов С.И., Рашитов М.М. Прогресс в области профилактики йододефицитных заболеваний в Республике Узбекистан (1998–2016). *Клиническая и экспериментальная тиреоидология.* 2016; 12 (3): 20–24. [Ismailov S.I., Rashitov M.M. Progress in the field of prevention of iodine deficiency diseases in the Republic of Uzbekistan (1998–2016). *Clinical and Experimental Thyroidology.* 2016; 12 (3): 20–24 (in Russ.)].
43. Bruno de Benoist, Erin McLean, Maria Andersson, Lisa Rogers. Iodine deficiency in 2007. Global progress since 2003. *Food, Nutrition Bulletin.* 2008; 29 (3): 195–202.
44. WHO: Iodine status worldwide: WHO Global Database on Iodine Deficiency. Geneva, 2004.
45. Rajwinder Harika, Mieke Faber, Folake Samuel, Judith Kimiywe, Afework Mulugeta and Ans Eilander Micro-nutrient Status and Dietary Intake of Iron, Vitamin A, Iodine, Folate and Zinc in Women of Reproductive Age and Pregnant Women in Ethiopia, Kenya, Nigeria and South Africa: A Systematic Review of Data from 2005 to 2015. *Nutrients.* 2017; 9: 1096. DOI: 10.3390/nu9101096.
46. Sustaining IDD programs in Eastern Europe. *IDD Newsletter.* 2016; 44 (4): 14–15.
47. Ershow A.G., Skeaff S.A., Merkel J.M., Pehrsson P.R. Development of Databases on Iodine in Foods and Dietary Supplements. *Nutrients.* 2018; Jan. 17; 10 (1). pii: E100. DOI: 10.3390/nu10010100.
48. Трошина Е.А. Заболевания, связанные с дефицитом йода: уроки истории и время принятия решений. *Проблемы эндокринологии.* 2011; 57 (1): 60–65. [Troshina E.A. Diseases associated with iodine deficiency: history lessons and decision-making time. *Problems of endocrinology.* 2011; 57 (1): 60–65 (in Russ.)]. DOI: 10.14341/probl201157160-65.
49. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Трошина Е.А. Йододефицитные заболевания в Российской Федерации: время принятия решений. М.: ОАО «Конти Принт», 2012. [Dedov I.I., Melnichenko G.A., Troshina E.A. Iodine Deficiency Disorders in the Russian Federation: Decision Time. Moscow: ОАО «Konti Print» Publ., 2012 (in Russ.)].
50. Суплотова Л.А., Макарова О.Б., Ковальжина Л.С., Шаруха Г.В. Профилактика йодного дефицита в Тюменской области: успех или неудача? *Клиническая и экспериментальная тиреоидология.* 2015; 11 (3): 39–46. [Suplotova L.A., Makarova O.B., Koval'zhina L.S., Sharuko G.V. Prophylaxis of iodine deficiency in the Tyumen region: success or failure? *Clinical and Experimental Thyroidology.* 2015; 11 (3): 39–46 (in Russ.)]. DOI: 10.14341/ket2015339-46.
51. Герасимов Г.А. Печальная статистика. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология.* 2015; 11 (4): 6–12. [Gerasimov G.A. Sad statistics. *Clinical and Experimental Thyroidology.* 2015; 11 (4): 6–12 (in Russ.)]. DOI: 10.14341/ket201546-12.
52. Платонова Н.М., Трошина Е.А. Йодный дефицит: решение проблемы в мире и России (25-летний опыт). *Consilium Medicum.* 2015; 04: 44–50. [Platonova N.M., Troshina E.A. Iodine deficiency: solving the problem in the world and in Russia (25 years of experience). *Consilium Medicum.* 2015; 04: 44–50 (in Russ.)].
53. Трошина Е.А., Платонова Н.М., Панфилова Е.А., Панфилов К.О. Аналитический обзор по результатам мониторинга основных эпидемиологических характеристик йододефицитных заболеваний у населения Российской Федерации за период 2009–2015 гг. *Проблемы эндокринологии.* 2018; 54 (1): 21–37. [Troshina E.A., Platonova N.M., Panfilova E.A., Panfilov K.O. Analytical review on the results of monitoring of the main epidemiological characteristics of iodine deficiency diseases in the population of the Russian Federation for the period 2009–2015. *Problems of Endocrinology.* 2018; 54 (1): 21–37 (in Russ.)]. DOI: 10.14341/pr9308.
54. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013–2020. WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.
55. Методы изучения йододефицитных заболеваний и мониторинг их устранения: рук-во для менеджеров программ; под ред. Г.А. Герасимова. 2-е изд. ВОЗ, 2003. Москва, 2003. [Methods of studying iodine deficiency diseases and monitoring their elimination. A guide for program managers. The second edition. Edited by G.A. Gerasimova. WHO, 2003. Moscow, 2003 (in Russ.)].
56. WHO, UNICEF, ICCIDD. Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. – Geneva: World Health Organization, 2001.
57. World Health Organization. Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. A guide for programmer managers. WHO, 2002.
58. World Health Organization, UNICEF, International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders. Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination: a guide for programme managers. 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2007: 98.

59. Степанова Е.М., Моругова Т.В. Мониторинг проблемы йодного дефицита на примере беременных женщин, проживающих в условиях йодного дефицита. *Медицина*. 2016; 4: 75–84. [Stepanova E.M., Morugova T.V. Monitoring the problem of iodine deficiency by the example of pregnant women living in iodine deficiency. *Medicine*. 2016; 4: 75–84 (in Russ.)].
60. Платонова Н.М. Йододефицитные заболевания (профилактика, диагностика, лечение и мониторинг): дис. ... д-ра. мед. наук ГУ «Эндокринологический научный центр РАМН». М., 2010. [Platonov N.M. Iodine deficiency diseases (prevention, diagnosis, treatment and monitoring): dis. of DM. M.: State Institution "Endocrinological Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences", 2010. (in Russ.)].
61. Rohner F., Zimmermann M., Jooste P., Pandav C., Caldwell K., Raghavan et al. Biomarkers of nutrition for development-iodine review. *J. Nutr.* 2014; 144 (8): 1322S–142S.
62. Setilla Dalili, Zahra Mohtasham-Amiri, Seyed Mahmood Rezvani, Arsalan Dadashi, Abdolreza Medghalchi, Simin Hoseini, Hajar Gholami-Nezhad, and Anis Amirhaki. The prevalence of iodine deficiency disorder in two different populations in northern province of iran: a comparison using different indicators recommended by WHO. *Acta Medica Iranica*. 2012; 50: 12.
63. Zimmermann M.B., Hess S.Y., Molinari L., De Benoist B., Delange F., Braverman L.E., Fujieda K, Ito Y, Jooste P.L., Moosa K., Pearce E.N., Pretell E.A., Shishiba Y. New reference values for thyroid volume by ultrasound in iodine-sufficient schoolchildren: a World Health Organization/Nutrition for Health and Development Iodine Deficiency Study Group Report. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79: 231–237. DOI: 10.1093/ajcn/79.2.231.
64. Spencer CA, Wang CC. Thyroglobulin measurement. Techniques, clinical benefits, and pitfalls. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 1995; 24 (4): 841–863.
65. Ma ZF, Skeaff SA. Thyroglobulin as a biomarker of iodine deficiency: a review. *Thyroid*. 2014; 24 (8): 1195–1209. DOI: 10.1089/thy2014.0052.
66. Zimmermann M.B., de Benoist B., Corigliano S., Jooste P.L., Molinari L., Moosa K., Pretell E.A., Al-Dallal Z.S., Wei Y., Zu-Pei C., Torresani T. Assessment of iodine status using dried blood spot thyroglobulin: development of reference material and establishment of an international reference range in iodine-sufficient children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91 (12): 4881–4887. DOI: 10.1210/jc.2006-1370.
67. Zimmermann M.B., Aeberli I., Andersson M., Assey V., Yorg J.A., Jooste P., Jukić T., Kartono D., Kusić Z., Pretell E., San Luis T.O. Jr., Untoro J., Timmer A. Thyroglobulin is a sensitive measure of both deficient and excess iodine intakes in children and indicates no adverse effects on thyroid function in the UIC range of 100–299 mug/L: a UNICEF/ICCIDD study group report. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013; 98 (3): 1271–1280. DOI: 10.1210/jc.2012-3952.
68. Щеплягина Л.А., Курмачева Н.А. Йодный дефицит: клиническое значение для беременных и кормящих женщин. *Гинекология*. 2011; 3: 63–66. [Shhepljagina L.A., Kurmacheva N.A. Iodine deficiency: a clinical value for pregnant and lactating women. *Gynecology*. 2011; 3: 63–66 (in Russ.)].
69. Исмаилов С.И., Рашитов М.М., Алимджанов Н.А., Узбеков К.К., Ваккасов М.Х., Муратов Т.Ф., Омилжонов М.Н. Изучение значимости тиреоглобулина в крови в качестве биомаркера при оценке тяжести йододефицитных состояний в Узбекистане. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2017; 13 (1): 20–25. [Ismailov S.I., Rashitov M.M., Alimdzhanov N.A., Uzbekov K.K., Vakkasov M.H., Muratov T.F., Omilzhonov M.N. Study of the importance of thyroglobulin in the blood as a biomarker in assessing the severity of iodine deficiency disorders in Uzbekistan. *Clinical and Experimental Thyroidology*. 2017; 13 (1): 20–25 (in Russ.)]. DOI: 10.14341/ket2017120-25.
70. Мельниченко Г.А., Маколина Н.П., Михина М.С., Платонова Н.М., Трошина Е.А. «Паттерновый подход», или поиск новых шаблонов. Комментарии к статье «Изучение значимости тиреоглобулина в крови в качестве биомаркера при оценке тяжести йододефицитных состояний в Узбекистане». *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2017; 13 (2): 57–61. [Mel'nichenko G.A., Makolina N.P., Mihina M.S., Platonova N.M., Troshina E.A. "Pattern approach", or search for new templates. Comments on the article "Study of the importance of thyroglobulin in the blood as a biomarker in assessing the severity of iodine deficiency conditions in Uzbekistan". *Clinical and Experimental Thyroidology*. 2017; 13 (2): 57–61 (in Russ.)]. DOI: 10.14341/ket2017257-61.
71. Mehran L. The impact of Iodine Status on the Recall Rate of the Screening Program for Congenital Hypothyroidism: Findings from Two National Studies in Iran. *Nutrients*. 2017. Oct 30; 9 (11): E1194. DOI: 10.3390/nu9111194.
72. Samantha Lain, Caroline Trumpff, Scott D. Grosse, Antonella Olivieri and Guy Van Vliet. Are lower TSH cut-offs in neonatal screening for congenital hypothyroidism warranted? *European Journal of Endocrinology*. 2017; 177: D1–D12. DOI: 10.1530/EJE-17-0107.
73. Delange F. Screening for congenital hypothyroidism used as an indicator of the degree of iodine deficiency and of its control. *Thyroid*. 1998; 8 (12): 1185–1192.
74. Vandevijvere S., Coucke W., Vanderpas J., Trumpff C., Fauvart M. et al. Neonatal Thyroid-Stimulating Hormone Concentrations in Belgium: A Useful Indicator for Detecting Mild Iodine Deficiency? *PLoS One*. 2012; 7 (10): e47770. DOI: 10.1371/journal.pone.0047770.
75. Дедов И.И., Безлепкина О.Б., Вагина Т.А., Байбарина Е.Н., Чумакова О.В., Караваева Л.В. Безлепкин А.С., Петеркова В.А. Скрининг на врожденный гипотиреоз в Российской Федерации. *Проблемы эндокринологии*. 2018; 64 (1): 14–20. [Dedov I.I., Bezlepkina O.B., Vagina T.A., Baybarina E.N., Chumakova O.V., Karavaeva L.V. Bezlepkin A.S., Peterkova V.A. Screening for congenital hypothyroidism in the Russian Federation. *Problems of Endocrinology*. 2018; 64 (1): 14–20.

- на Т.А., Bajbarina E.N., Chumakova O.V., Karavaeva L.V., Bezlepkin A.S., Peterkova V.A. Screening for congenital hypothyroidism in the Russian Federation. *Problems of Endocrinology*. 2018; 64 (1): 14–20 (in Russ.]. DOI: 10.14341/probl8752.
76. Суплотова Л.А., Макарова О.Б., Ковальжина Л.С. Неонатальная гипертиреотропинемия – индикатор оценки тяжести йодного дефицита в популяции? *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2015; 11 (3): 47–53. [Suplotova L.A., Makarova O.B.,

Koval'zhina L.S. Is neonatal hyperthyrotropinemia an indicator of the severity of iodine deficiency in a population? *Clinical and Experimental Thyroidology*. 2015; 11 (3): 47–53 (in Russ.]. DOI: 10.14341/ket2015347-53.

77. Герасимов Г.А. Россия – страна контрастов. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2017; 13 (2): 6–12. [Gerasimov G.A. Russia is a country of contrasts. *Clinical and Experimental Thyroidology*. 2017; 13 (2): 6–12 (in Russ.]. DOI: 10.14341/ket201726-12.

Сведения об авторах

Суплотова Людмила Александровна, д-р мед. наук, профессор, зав. курсом эндокринологии кафедры терапии, Тюменский ГМУ, гл. эндокринолог Тюменской области, г. Тюмень. ORCID iD 0000-0001-9253-8075.

Макарова Ольга Борисовна, канд. мед. наук, доцент, кафедра терапии, Тюменский ГМУ, г. Тюмень. ORCID iD 0000-0003-4663-0289.

Ковальжина Лариса Сергеевна, канд. социол. наук, доцент, кафедра менеджмента в отраслях ТЭК, Тюменский индустриальный университет, г. Тюмень. ORCID iD 0000-0002-1650-1243.

Шаруха Галина Васильевна, д-р мед. наук, руководитель Управления федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Тюменской области, г. Тюмень. ORCID iD 0000-0003-0772-8224.

(✉) Суплотова Людмила Александровна, e-mail: suplotoval@mail.ru.

Authors information

Suplotova Ludmila A., DM, Professor, Head of the Therapy Department, Tyumen State Medical University, Head Endocrinologist of the Tyumen Region, Tyumen, Russian Federation.

Makarova Olga B., PhD, Assistant Professor, Therapy Department, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation.

Kovalzhina Larisa S., PhD, Assistant Professor, Management in the Sectors of Energy, Industrial University of Tyumen, Tyumen, Russian Federation.

Sharuho Galina V., DM, Head of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights and Human Welfare in the Tyumen Region, Tyumen, Russian Federation.

(✉) Suplotova Ludmila A., e-mail: suplotoval@mail.ru.

Received 15.08.2018
Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 15.08.2018
Подписана в печать 17.12.2018

УДК 616.981.21-092.19:578.72:579.862.1
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-109-118>

Преодоление защитных функций макрофагов факторами вирулентности *Streptococcus pyogenes*

Фрейдлин И.С.^{1,2}, Старикова Э.А.¹, Лебедева А.М.¹

¹ Институт экспериментальной медицины
Россия, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет (ПСПбГМУ) имени академика И.П. Павлова
197022, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8

РЕЗЮМЕ

Обзор посвящен анализу молекулярных механизмов действия факторов вирулентности *S. pyogenes*, направленных на преодоление защитных функций макрофагов. Подробно описаны основные защитные функции макрофагов и механизмы их реализации в ходе развития стрептококковой инфекции. Рассмотрены факторы вирулентности *S. pyogenes*, препятствующие рекрутированию макрофагов в очаг инфекции. Особое внимание уделено анализу молекулярных механизмов подавления патогенном процессе фагоцитоза, внутриклеточной бактерицидности и продукции цитокинов макрофагами. Проведен анализ молекулярно-генетических механизмов регуляции экспрессии факторов вирулентности *S. pyogenes*, обеспечивающих адаптацию патогена к меняющимся условиям в очаге воспаления.

Ключевые слова: макрофаги, стрептококковая инфекция, *S. pyogenes*, фагоцитоз, бактерицидность.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00150.

Для цитирования: Фрейдлин И.С., Старикова Э.А., Лебедева А.М. Преодоление защитных функций макрофагов факторами вирулентности *Streptococcus pyogenes*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 109–118. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-109-118>.

УДК 616.981.21-092.19:578.72:579.862.1
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-109-118>

Overcoming the protective functions of macrophages by *Streptococcus pyogenes* virulence factors

Freydlin I.S.^{1,2}, Starikova E.A.¹, Lebedeva A.M.¹

¹ Institute of Experimental Medicine
12, Akademika Pavlova Str., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

✉ Фрейдлин Ирина Соломоновна, e-mail: irinaf-n@yandex.ru.

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
6-8, L'va Tolstogo Str., Saint Petersburg, 197022, Russian Federation

ABSTRACT

The review is devoted to the analysis of molecular mechanisms of action of *S. pyogenes* virulence factors aimed at overcoming the protective functions of macrophages. The review describes in detail the main protective functions of macrophages and the mechanisms of their implementation in the course of streptococcal infection. The virulence factors of *S. pyogenes*, which prevent the recruitment of macrophages to the site of infection, are examined. Particular attention is paid to the analysis of molecular effects that suppress the pathogen by the process of phagocytosis, intracellular bactericidal activity and the production of cytokines by macrophages. The analysis of molecular genetic mechanisms of regulation of the expression of *S. pyogenes* virulence factors that provide adaptation of the pathogen to changing conditions in the site of inflammation is carried out.

Key words: macrophages, streptococcal infection, *S. pyogenes*, phagocytosis, bactericidal activity.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This work was supported by the RFBR grant No. 16-04-00150.

For citation: Freydlin I.S., Starikova E.A., Lebedeva A.M. Overcoming the protective functions of macrophages by *Streptococcus pyogenes* virulence factors. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 109–118. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-109-118](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-109-118).

ВВЕДЕНИЕ

Streptococcus pyogenes (*S. pyogenes*) – стрептококк группы А (GAS), является патогеном исключительно для человека. Стрептококковые инфекции и вызываемые ими осложнения входят в первую десятку основных причин смертности от инфекций во всем мире. Ежегодно GAS вызывает 700 млн инфекций, в том числе 1,8 млн инвазивных. GAS в основном является возбудителем инфекций средней тяжести с поражением кожи и слизистых: фарингит, скарлатина, рожа, пиодермия (импетиго). Значительно реже стрептококковая инфекция приводит к тяжелым заболеваниям: сепсису, пневмонии, менингиту, синдрому токсического шока, некротизирующему фасцииту. Кроме того, доказана пусковая роль GAS в развитии аутоиммунных заболеваний: ревматической лихорадки, гломерулонефрита, реактивных артритов. *S. pyogenes* может оставаться в состоянии носительства. У 30% людей выявлена колонизация стрептококком носоглотки. С середины 1980-х гг. повысилось число случаев тяжелых системных стрептококковых инфекций, вызванных GAS серотипов M1 и M3. Выделение одних и тех же штаммов при инфекциях разной степени тяжести свидетельствует о зависимости тяжести инфекций и их исходов от полноценности механизмов защиты организма хозяина.

Пиогенные стрептококки относят к внеклеточно паразитирующим бактериям, высокая па-

тогенность которых связана с быстрыми темпами размножения и с наличием множества факторов вирулентности, направленных на преодоление и нейтрализацию эффекторных функций клеток врожденного иммунитета организма-хозяина. Входными воротами инфекции GAS чаще всего служат эпителий слизистой носоглотки или кожа, что определяется тропностью стрептококков к этим тканям. Когда стрептококк преодолевает эпителиальный барьер, в субэпителиальной соединительной ткани он встречается с макрофагами (Мф), которые образуют первую линию защиты от патогена. Макрофаги экспрессируют широкий спектр рецепторов для распознавания консервативных структур бактерий (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), что объясняет их способность инициировать воспаление и иммунный ответ. Эти клетки способны элиминировать патогены путем фагоцитоза и выполняют функцию антигенпрезентации при формировании адаптивного ответа на инфекцию [1].

Ведущая защитная роль макрофагов при стрептококковой инфекции была доказана в нескольких сериях экспериментов с искусственным удалением Мф из организма мышей. Удаление CCR2-положительных макрофагов с помощью дифтерийного токсина приводило к усилению диссеминации GAS и повышению летальности зараженных животных [2, 3]. Системная деплеция Мф с помощью хлордроната или использование

трансгенных CCR2-дефектных мышей сильно повышали диссеминацию GAS в мягких тканях независимо от сохранности рекрутирования полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ). Повышенную диссеминацию GAS удавалось ревертировать при внутривенном введении моноцитов (Мн) или внутрибрюшинном введении перитонеальных Мф. При моделировании у мышей недостаточности Мф каррагинаном или гадолинием III хлоридом была выявлена следующая закономерность: мыши становились высокочувствительны к GAS в случае удаления Мф до заражения или в первые 24 ч после заражения [2]. У дефицитных по цитокину – фактору некроза опухоли альфа (TNF α) – мышей не происходило рекрутирования Мф в очаг инфекции, хотя инфильтрация ПЯЛ была не нарушена. Показана зависимость диссеминации GAS от TNF α , так как резидентные Мф нуждались в помощи Мн, рекрутированных при участии TNF α [4].

Во многом благодаря реализации эффекторного и регуляторного потенциала макрофагов, после преодоления эпителиального барьера стрептококки чаще всего подвергаются элиминации. Однако вирулентными штаммами стрептококков выработаны механизмы, позволяющие противодействовать макрофагам на всех этапах реализации их защитных функций: блокировать действие хемоаттрактантных факторов, ингибировать фагоцитоз или способствовать инвазии в клетки организма-хозяина и внутриклеточному выживанию [1].

Способность GAS вызывать системные инфекции зависит от его устойчивости к факторам врожденного иммунитета, препятствующим его диссеминации, к которым относятся фагоцитирующие клетки: гранулоциты и макрофаги. При использовании биоинформационного анализа полного генома *S. pyogenes* были идентифицированы гены, ответственные за способность GAS нарушать процессы рекрутирования фагоцитов, ингибировать участие комплемента и антител в опсонизации, подавлять механизмы захвата бактерий, противостоять факторам бактерицидности, регулировать апоптоз фагоцитов [5].

ПРЕПЯТСТВИЕ РЕКРУТИРОВАНИЮ МАКРОФАГОВ В ОЧАГ ИНФЕКЦИИ

При биопсии, взятой у пациентов с генерализованной инфекцией GAS, было показано присутствие содержащих GAS Мф в очаге инфекции. [2, 6]. Моноциты мигрируют в очаг инфекции по градиенту концентрации соответствующих хемоаттрактантов. Функции хемоаттрактантов могут выполнять компоненты и продукты деградации микроорганизмов, продукты деструкции тканей

организма-хозяина, активированная фракция комплемента C5a или молекулы цитокинов семейства хемокинов, в первую очередь IL8. Патогенные GAS обладают факторами вирулентности, разрушающими отдельные хемоаттрактанты или угнетающими их активность. Стрептококковые мембран-связанные протеолитические ферменты C5a-пептидаза (ScpA) и сериновая протеаза (SpyCER) инактивируют компонент комплемента C5a, препятствуя хемотаксису и рекрутированию клеток в очаг инфекции. Мутация гена, контролирующего экспрессию C5a-пептидазы, повышает темпы очищения организма зараженных подкожно мышей от стрептококка [7]. Кроме того, GAS экспрессируют поверхностно-ассоциированный C5a-связывающий протеин (C5aBP), способный разрушать C5a компонент системы комплемента [8]. Стрептококковая сериновая протеаза SpyCER катализирует расщепление и инактивацию хемокинов IL-8, KC, MIP-2 [5].

ВМЕШАТЕЛЬСТВО В МЕХАНИЗМЫ ФАГОЦИТОЗА МАКРОФАГОВ

Рецепторы макрофагов, участвующие в фагоцитозе, принято делить на опсонические (CR – рецепторы белков комплемента и FcR – рецепторы Fc-фрагментов молекул иммуноглобулинов) и неопсонические, которые связываются непосредственно с лигандами в составе бактерий. К неопсоническим относятся: семейство паттерн-распознающих рецепторов (pattern recognition receptors, PRR), лектины, маннозные рецепторы (MR), рецепторы β -глюкана (дектин-1), SR-A, MARCO. PRR, в том числе toll-like receptors (TLR), распознают и связывают бактериальные патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), к которым относятся компоненты клеточной стенки стрептококка (липопротеины, липопептиды, пептидогликаны, липотейхоевая кислота), являющиеся лигандами TLR2.

Когда TLR2 связывают PAMP стрептококков, активируются факторы транскрипции nuclear factor-kappa B (NF κ B) и семейства IRF. Передача сигнала от TLR в клетку осуществляется, преимущественно, через сигнальный адаптер myeloid differentiation factor 88 (MyD88). Показана необходимость MyD88 для запуска воспалительного ответа на GAS. При дефиците MyD88 у фагоцитирующих клеток драматически снижена продукция фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкина (IL) 6, IL-12, интерферона (IFN) типа I. MyD88 опосредует рекрутирование Мф в очаг и предупреждает инвазирование бактерий [9]. В распознавании PAMP стрептококка важную роль играют внутри-

клеточные паттерн-распознающие рецепторы – NOD-подобные рецепторы (NLRs). Пептидогликаны клеточной стенки бактерий являются лигандами поверхностных TLR2, однако после захвата бактерий в цитоплазме Мф от пептидогликанов отщепляется мурамилдипептид (MDP), который связывается с nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2), что является дополнительным фактором активации инфламмасом [10].

PRRs играют главную роль в распознавании бактерий, индукции провоспалительного сигнала и продукции цитокинов, но не участвуют непосредственно в фагоцитозе. Фагоцитарными рецепторами служат опсонические рецепторы CR и FcR, а из неопсонических – MR и SR-A. Мф экспрессируют полный набор Fcγ-рецепторов – FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16) и рецепторы для компонентов комплемента, которые распознают фрагменты C3b и C3d – CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18, или Mac-1) и CR4 (CD11c/CD18, или p150,95). CR3 связываются с C3-лигандами, образующимися при активации системы комплемента, и опосредуют миграцию и фагоцитоз. Связывание с FcR опсонизирующих антител ведет к активации внутриклеточных тирозин-киназ, индукции респираторного взрыва и продукции метаболитов арахидоновой кислоты.

Антифагоцитарную защиту стрептококка обеспечивает капсула, которая состоит из полимеров высокомолекулярной гиалуроновой кислоты (НА) или гиалурона и N-ацетилглюкозамина. Капсула является одним из факторов адгезии и инвазии стрептококка и создает физический барьер, препятствующий доступу фагоцитов к бактериальным клеткам. Нативная капсульная гиалуроновая кислота ингибирует захват бактерий Мф и повышает выживаемость GAS в организме мышей. Частичная деградация НА стрептококковой гиалуронидазой повышала захват GAS Мф *in vitro* и лимитировала развитие инфекции у мышей [8]. При инфекции высокомолекулярная НА превращается в низкомолекулярные продукты деградации, которые в отличие от нативной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты не снижают захват GAS Мф и не повышают их выживания в крови. Поэтому генерация короткоцепочечных фрагментов НА может играть протективную роль при инфекции [11].

Компоненты клеточной поверхности стрептококков, такие как М- и Т-протеины, связывающие фибронектин, ламинин, могут препятствовать захвату бактерий. GAS использует различные белки матрикса (фибронектин, коллаген) для формирования крупных агрегатов, превосходящих размеры, доступные для фагоцитоза. Секретируемый

GAS мультифункциональный белок SIC нарушает биофизические процессы, необходимые для фагоцитоза [8]. Проведенное исследование *in vitro* показало, что белок M111 *S. pyogenes* обладает антифагоцитарными свойствами [12].

На поверхности стрептококка экспрессирован фермент энолаза, участвующий в связывании плазмينا. Другим белком, связывающим плазмин, является секретируемая стрептококками стрептокиназа (Ska), обладающая фибринолитическими свойствами. Протеаза Ska превращает плазминоген в плазмин, который откладывается на поверхности GAS, препятствует фагоцитозу и способствует диссеминации бактерий [8].

Фибронектин и другие белки на поверхности стрептококка препятствуют связыванию CR3 и FcR с их лигандами. Система комплемента имеет механизм саморегуляции: белок C4BP и фактор FH для ограничения активации комплемента. GAS обладает способностью связывать эти белки и препятствовать опсонофагоцитозу. Фибриллярный поверхностный белок GAS М-протеин связывается с C4BP и FH-фактором H, что препятствует отложению C3b на поверхности бактерий. М-протеин, связывая фибриноген, снижает активность C3-конвертазы при классическом пути активации комплемента [7]. GAS имеет несколько поверхностных белков, способных связывать фибронектин FBP, которые способствуют избеганию фагоцитоза GAS путем ингибции активности комплемента. M1-серотип GAS секретирует протеиновый сывороточный ингибитор SIC, угнетающий комплемент-опосредованный лизис бактерий и участвующий в обеспечении резистентности к фагоцитозу [4]. Молекула CD46, которая экспрессирована на поверхности моноцитов, принадлежит к семейству регуляторов активности комплемента и инактивирует белки C3b и C4b системы комплемента. М-протеин GAS способен связываться с CD46 на поверхности клеток, препятствуя опсонофагоцитозу [7].

Сигналинг от CR3 менее эффективен по сравнению с FcR в индукции респираторного взрыва при фагоцитозе. FcR-опосредованный захват бактерий ведет к их транспорту в фагосомы с последующим слиянием с лизосомами, гибелью и разрушением бактерий. Это позволяет считать взаимодействие иммуноглобулинов с FcR наиболее эффективным вариантом опсонизации. GAS использует разные пути препятствия этому варианту опсонизации. GAS продуцирует эндопептидазу immunoglobulin G-degrading enzyme (IdeS) – фермент, специфичный к области hinge молекулы иммуноглобулина (Ig) G, способный интерфери-

ровать с эффекторными функциями IgG, в частности с опсонизацией для фагоцитоза [13]. Продуцируемые бактериями фибронектин-связывающие белки, разные типы М-протеина, Н-протеин связываются с Fc-областью Ig, препятствуя опсонофагоцитозу Мф. Протеазы цистеина Mac-1/Ides способны разрушать все изотипы Ig *in vitro*. Mac2-протеин обладает способностью связываться с FcRII и FcRIII, ингибируя распознавание Ig на поверхности бактерий. Как и Mac-1/Ides, Mac2 проявляет эндопептидазную активность. Секретируемый стрептококками белок EndoS гидролизует гликан в молекуле Ig, препятствуя его распознаванию Fc-рецепторами макрофагов, блокируя классический путь активации комплемента и опсонофагоцитарную реакцию [5].

Недавно было показано, что стрептококковый пирогенный экзотоксин В (Streptococcal pyrogenic exotoxin B, SpeB) является цистеин-протеиназой, препятствующей фагоцитозу за счет протеолитической активности и способности разрушать: гликопротеины матрикса (FN, витронектин, ламинин), IL-1, хемокины, иммуноглобулины, компоненты комплемента и плазминоген организма хозяина, участвующие в опсонизации бактерий. SpeB-дефектные мутанты легче фагоцитировались, а GAS дикого штамма эффективно разрушали C3b [8].

МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ВЫЖИВАНИЯ *S. PYOGENES* В МАКРОФАГАХ

Представление о GAS как о внеклеточно паразитирующей бактерии в настоящее время пересматривается в связи с новыми экспериментальными данными. Показана способность GAS выходить из фагосом в цитоплазму Мф, где они находят более подходящие условия для выживания [5]. Возможность пролиферации *S. pyogenes* в живых человеческих макрофагах на уровне клеточной популяции и на уровне отдельных клеток убедительно доказана в исследовании O'Neill и соавт. [14], в котором показано, что для активной внутриклеточной пролиферации стрептококков важным условием является их выход из фагосом в цитозоль.

Наиболее вирулентные штаммы стрептококка могут длительно выживать внутри макрофагов, которые при этом обеспечивают их защиту от других иммунных механизмов и от действия антибиотиков. Неоднократно выявляли живые *S. pyogenes* в макрофагах из биоптатов пораженных тканей от больных инвазивной инфекцией [6, 15]. Показана способность *S. pyogenes* выходить из Мф с последующим инфицированием других клеток, т. е. МФ могут служить резервуаром диссеминации и продолжения повреждения тканей [15].

Для вирулентных штаммов *S. pyogenes* описано несколько механизмов устойчивости к гибели внутри макрофагов. Экспрессированный на поверхности бактерий М-протеин служит важным фактором, подавляющим созревание фагосом и выживание *S. pyogenes* в Мф человека [15]. Внутриклеточное выживание *S. pyogenes* связано с М-протеин-зависимым нарушением внутриклеточного движения по пути «фагосома – лизосома». Показано участие белка M1 в механизме избегания слияния фагосом, содержащих *S. pyogenes*, с лизосомами макрофагов [16]. Фагоцитарная вакуоль, содержащая экспрессирующие M1 протеин *S. pyogenes*, служит для бактерий нишей выживания и репликации. Нарушение созревания фаголизосом может ограничивать контакт с кислородными радикалами и индукцию окислительного взрыва. Пиогенные стрептококки экспрессируют глутатион пероксидазу GroA, мощный антиоксидантный фактор, позволяющий им адаптироваться к оксидативному стрессу в фаголизосомах [5].

Установлено, что гемолитический экзотоксин стрептолизин О (SLO) ингибирует транспорт бактериальных клеток в фагосомы и облегчает их выход из фагосом в цитозоль [4]. SLO генетически и функционально связан с другим фактором вирулентности стрептококка – NAD-гликогидролазой (NADase), которая является котоксином SLO [4]. Дефицитные по NADase штаммы стрептококков отличаются более низкой вирулентностью в мышинных моделях [17]. Продукция фагоцитированными стрептококками SLO приводит к формированию пор в мембранах фаголизосом, что способствует транслокации NADase в цитозоль МФ. NADase участвует в подавлении созревания фагосом, ингибции ацидификации фаголизосом и транспорта фагоцитированных бактерий в лизосомы [17, 18].

ПОДАВЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ БАКТЕРИЦИДНОСТИ МАКРОФАГОВ

Судьба фагоцитированных бактерий зависит от процесса слияния лизосом с фагосомой, который обеспечивает целенаправленное попадание факторов микробицидности непосредственно в фагосому без повреждения цитоплазматических структур клетки. В благоприятном случае фагоцитированные бактерии погибают через 30–60 мин после захвата под действием факторов микробицидности, к которым относятся образующиеся в ходе респираторного взрыва активные формы кислорода, оксид азота (NO), бактерицидные ферменты (миелопероксидаза, лизоцим), нейтральные протеиназы (эластаза, катепсин G, протеиназа-3), кислые гидролазы (N-ацетил-β-

глюкозаминидаза, катепсин В, катепсин D, β -глюкуронидаза, β -глицерофосфатаза, α -маннозидаза), арилсульфатаза, а также кислые гликозаминогликаны (мукополисахариды). Выживание и длительная персистенция патогена в клетках организма-хозяина возможны при мобилизации патогенными стрептококками разных механизмов подавления факторов микробицидности.

Пиогенные стрептококки, как все молочнокислые бактерии, используют гликолиз для получения энергии и продуцируют лактат как конечный продукт метаболизма. Поэтому закисление окружающей среды является естественным следствием роста этих микроорганизмов [19]. Одним из механизмов, позволяющих стрептококкам адаптироваться к кислотному стрессу, является продукция аммиака и аденозин-трифосфата в реакции гидролиза аргинина, который осуществляет система ферментов аргининдеиминазы (АД) [20]. АД является одним из трех ферментов, осуществляющих конверсию аргинина в орнитин, аммиак и CO_2 , с параллельной продукцией АТФ. Это помогает бактериям преодолевать дефицит кислорода, питательных веществ и выживать в разных биологических нишах [21, 22].

В ряде исследований показано, что АД играет существенную роль для инвазирования и выживания *S. pyogenes* в эпителиальных клетках человека. Так, установлено, что мутантный штамм *S. pyogenes* с делецией гена АД (*arcA*) обладает сниженной способностью к инвазии и внутриклеточному росту по сравнению с исходным штаммом [23]. Исследования *in vitro* на культурах Нер-2С и А549 показали, что мутантный штамм, не экспрессирующий АД, примерно в 3–5 раз слабее инвазировал эпителиальные клетки по сравнению с исходным штаммом. Оба исследуемых штамма *S. pyogenes*, исходный и мутантный, были одинаково чувствительны к низкому рН. Однако аргинин в концентрации 1 мМ достоверно повышал выживаемость в кислой среде только исходного штамма [23, 24].

Несмотря на активные исследования, точные механизмы, благодаря которым АД способствует внутриклеточному выживанию и даже репликации бактерий, до сих пор не ясны [25]. Вероятно, АД препятствует закислению среды в фагосоме благодаря продукции аммиака. Это не только защищает бактерии от потенциально летального действия низких показателей рН, но и препятствует слиянию фагосомы с лизосомой [20, 26]. Нельзя исключать, что АТФ, продуцируемый в рамках системы ферментов АД, служит источником энергии для F1FO-АТФазы, которая поддерживает цитоплазматический кислотно-щелочной баланс за счет активного транспорта протонов из клетки [20, 27].

Среди факторов микробицидности Мф важное место занимает NO. В организме млекопитающих единственным субстратом для генерации NO при участии NO-синтазы (NOS) является аргинин [28], поэтому биодоступность этой аминокислоты является фактором, ограничивающим продукцию NO [29]. За счет деплеции аргинина фермент АД может улучшать условия выживания бактерий в фаголизосомах [25]. В пользу этой гипотезы говорят данные, полученные в наших исследованиях с использованием продуктов ультразвукового разрушения двух штаммов: исходного *S. pyogenes* M49-16 и мутантного *S. pyogenes* M49-16 *delArcA* с инактивированным геном АД (*arcA*). В этих экспериментах показано, что способность стрептококков ингибировать продукцию макрофагами NO зависит от наличия у них аргининдеиминазной активности.

Исходный штамм, экспрессирующий АД и обладающий способностью гидролизовать аргинин из среды, подавлял индуцированную ЛПС продукцию NO макрофагами линии J774. В отличие от этого мутантный штамм *S. pyogenes* M49-16 *delArcA* подобным действием не обладал. При добавлении в среду избытка аргинина, ингибирующего продукцию NO, действие исходного штамма *S. pyogenes* M49-16 нивелировалось, что явилось дополнительным доказательством зависимости синтеза NO макрофагами от биодоступности субстрата для индуцированной NOS [30].

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ МАКРОФАГАМИ

Распознавание стрептококковых PAMPs с участием TLRs макрофагов ведет к рекрутированию лейкоцитов и усиленной продукции ими провоспалительных цитокинов. Взаимодействие GAS с TLR-2 макрофага запускает каскад внутриклеточных сигналов, ответственных за активацию транскрипционных систем: NF- κ B, IRFs и MAPK. *S. pyogenes* влияет на экспрессию цитокинов с помощью прямой активации транскрипционного фактора NF- κ B или опосредованно через активацию белков STAT.

При распознавании PAMP стрептококка активируются продукция и секреция Мф провоспалительных цитокинов: IL-1, TNF α и хемокинов IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP) 2, MIP-1 α , monocyte chemoattractant protein (MCP). Первоначально секретируются хемокины, ответственные за рекрутирование нейтрофилов [31]. Продукты разрушения молекулы пептидогликана распознаются NOD-белками и вовлекаются в активацию транскрипционного фактора NF- κ B. Кроме того, NOD-белки регулируют цистеин-протеазу – каспазу-1, активация которой ведет к уси-

лению продукции провоспалительного цитокина IL-1 β . IL-1 β продуцируется в виде неактивной проформы pro-IL-1, которая затем деградирует с генерацией зрелой формы IL-1 [32]. Созревание IL-1 под влиянием цистеин-протеазы каспазы-1 связано с активацией NALP3-зависимых цитозольных мультибелковые комплексов, получивших название «инфламмосомы». Кроме каспазы-1 инфламмосомы содержат «протеин-сенсор» Nlrp3, который может быть активирован разными стимулами, включая стрептококковый SLO в GAS-стимулированных Мф. Nlrp3 mRNA экспрессируется в Мф конститутивно, а в первые 3 ч после заражения GAS происходит четырехкратное повышение экспрессии гена Nlrp3 [10]. Одновременно пиогенные стрептококки могут продуцировать факторы вирулентности, ингибирующие активацию инфламмосом и созревание IL-1 β . Показано, что стрептококковая NADase снижает инфламмосом-зависимую секрецию IL-1 инфицированными Мф, что представляет один из механизмов избегания стрептококком иммунной защиты [17].

При использовании биоинформационного анализа полного генома *S. pyogenes* идентифицирован новый фактор вирулентности, названный «5-нуклеотидаза А» (S5nA). Внеклеточная S5nA осуществляет конверсию АМР в аденозин, который подавляет иммунный ответ за счет ингибции синтеза макрофагами провоспалительных цитокинов [33].

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ GAS В ХОДЕ РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИИ

Способность *S. pyogenes* выживать в жестких условиях микроокружения организма-хозяина определяется наличием у этих бактерий специальных сенсоров, которые призваны регулировать экспрессию факторов вирулентности в постоянно меняющихся условиях развития инфекции. У пиогенного стрептококка адаптивный ответ на сигналы от микроокружения организма-хозяина регулируется сложной сетью глобальных транскрипционных регуляторов. К ним относятся: двухкомпонентный сенсор-регулятор, отдельно стоящие регуляторы ответа и альтернативные сигма-факторы, кодирующие двухкомпонентную регуляторную систему (TCS). У *S. pyogenes* обнаружено 13 разных генов TCSs, из которых изучены более подробно гены регуляторов: CowR/S, FasBCAX, SptR/S и Ink/Irr. Двухкомпонентный глобальный транскрипционный регулятор CowR/S, который контролирует 15% генома *S. pyogenes*, охарактеризован как репрессор транскрипции факторов вирулентности гиалуро-

новой капсулы, цистеин-протеазы SpeB, цитотоксина SLS, стрептокиназы, стрептолизина О и S, цистеин-протеазы Mac/IdeS. В раннюю фазу инфекции наблюдали выраженное стимулирующее действие генов *ink*, *irr*, которые контролируют 20% генома GAS, в том числе синтез пептидогликанов клеточной стенки и факторов, поддерживающих выживание бактерий в Мф. Активация регулятора Ink/Irr при одновременной ингибции негативного транскрипционного регулятора CowR/S ведет к усилению экспрессии нескольких факторов вирулентности: SLS, SIC, ДНКазы, М-протеина, И-8 протеазы, SodA, гиалуроновой капсулы. При этом активируются факторы, блокирующие фагоцитоз и повышающие устойчивость GAS к бактерицидному действию Мф. Мутации генов факторов вирулентности и генов глобальных транскрипционных регуляторов в процессе взаимодействия бактерий с Мф могут приводить к сдвигам бактериального генотипа в направлении усиления инвазивности. Это считают одной из причин перехода бактерионосительства в развитие инвазивной стрептококковой инфекции [5].

С использованием современных методов молекулярной биологии удалось показать, что в ходе развития инфекции и взаимодействия GAS с Мф геном бактерий претерпевает значительные изменения в направлении повышения экспрессии факторов вирулентности [34]. Через 2 ч после инфицирования выявлены изменения генома и протеома *S. pyogenes* по сравнению с внеклеточными бактериями. Во внутриклеточном окружении значительно изменилась экспрессия 145 генов стрептококка, контролирующих метаболические и энергозависимые процессы. В раннюю внутриклеточную фазу происходило повышение экспрессии генов *ink* и *irr*. Экспрессия генов, ответственных за индукцию окислительного взрыва в Мф, в первые 2 ч была снижена. Через 6 ч повышалась экспрессия генов, ответственных за продукцию М-протеина как фактора выживания стрептококков в Мф [35].

Наиболее ярким примером фазовых изменений факторов вирулентности GAS в динамике стрептококковой инфекции и взаимодействия с Мф являются изменения экспрессии цистеин-протеазы SpeB стрептококка. SpeB, наряду с протеолитической деградацией многих белков организма-хозяина, оказалась способна разрушать большинство белков, секретируемых GAS, включая факторы вирулентности: М-протеин, стрептокиназу, SpeF, Sda1, C5a пептидазу, секретируемый ингибитор комплемента. Поэтому повышенная экспрессия SpeB приводит к снижению вирулентности бак-

терий. Разрушая собственный поверхностный М-протеин стрептококка, SpeB повышает чувствительность бактерий к фагоцитозу. В клинико-эпидемиологических исследованиях обнаружена обратная корреляция между тяжестью инфекции M1T1 GAS и экспрессией стрептококковой SpeB. Исследование биоптатов пораженных тканей при инвазивных стрептококковых инфекциях выявило наряду с Мф, содержащими живые стрептококки, повышенное количество SpeB [6]. У инвазивных штаммов GAS экспрессию SpeB регулирует зависимый от фазы роста бактерий фермент эндопептидаза PerO, которая влияет на экспрессию гена *speB* и вирулентность стрептококка [36].

Защитные факторы организма-хозяина оказывают давление на патоген в направлении селекции штаммов, приобретающих новые гены или сохраняющих ключевые факторы вирулентности, необходимые для выживания в определенных нишах организма. В частности, в организме идет преимущественная селекция SpeB-отрицательных бактерий или обеспечивается подавление активности SpeB для поддержания сохранности факторов вирулентности *S. pyogenes*. Ингибция экспрессии SpeB обеспечивает оптимальные условия в нишах организма для персистенции бактерий с сохранением их полного арсенала факторов вирулентности и повышением их патогенного потенциала [37]. Через 60–80 ч после инфицирования стрептококки поселяются в нишах внутренней среды организма (в том числе в макрофагах), которые предназначены для выживания и размножения бактерий и где происходит селекция более подходящих мутантов, лучше защищенных от факторов иммунитета. Наиболее подходящими оказываются мутанты, лишенные экспрессии SpeB [38]. При моделировании инфекции введением штамма SpeB+/SpeA– M1T1 GAS в подкожную камеру мышам обнаружили изменение протеома бактерий: стабильный фазовый сдвиг в сторону фенотипа SpeB–/SpeA+, экспрессирующего и секретирующего полный набор факторов вирулентности. Протеом этого фенотипа SpeB–, приобретенный *in vivo*, не отличался от протеома изогенного мутанта с делецией гена *speB*. Другим примером может служить спонтанная мутация в опероне CowR/S, приводящая к утрате экспрессии SpeB и к усилению транскрипции генов нескольких факторов вирулентности GAS с развитием системной GAS-инфекции [39]. Таким образом, при стрептококковой инфекции осуществляется регуляция экспрессии факторов вирулентности патогена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы широкое использование современных методов молекулярной генетики и протеомики позволило значительно уточнить и конкретизировать наши представления о факторах вирулентности патогенных стрептококков. С помощью биоинформационного анализа полного генома у патогенных штаммов *S. pyogenes* были идентифицированы гены, ответственные, в частности, за способность противодействовать защитным функциям макрофагов: мобилизации в очаг инфекции, захвату бактерий, их внутриклеточной гибели. Названы конкретные гены, контролирующие отдельные механизмы агрессии, значительная часть которых направлена на подавление защитных функций макрофагов. Кроме того, выявлена сложная сеть генов глобальных транскрипционных регуляторов экспрессии многих факторов вирулентности *S. pyogenes*. Показано, что на разных стадиях инфекции и взаимодействия с макрофагами геном *S. pyogenes* претерпевает значительные изменения в направлении повышения экспрессии факторов вирулентности. Экспериментально доказанная способность *S. pyogenes* выживать и пролиферировать внутри клеток организма-хозяина, в том числе в макрофагах, заставляет пересмотреть классическое представление о принадлежности *S. pyogenes* к внеклеточно паразитирующим бактериям. Уточнение природы факторов вирулентности *S. pyogenes* может стать основой поиска средств их нейтрализации в качестве одного из путей лечения инфекции, вызванной инвазивным патогеном. Детальная оценка путей регуляции взаимодействия макрофагов с *S. pyogenes* может быть положена в основу разработки новых лекарственных средств, направленных на активацию механизмов врожденного иммунитета против *S. pyogenes*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Goldmann O., Rohde M., Chhatwal G.S., Medina E. Role of Macrophages in Host Resistance to Group A Streptococci. *Infection and Immunity*. 2004; 72 (5): 2956–2963. DOI: 10.1128/IAI.72.5.2956-2963.2004.
2. Mishalian I., Ordan M., Peled A., Maly A., Eichenbaum M.B., Ravins M., Aychek T., Jung S., Hanski E. Recruited Macrophages Control Dissemination of Group A Streptococcus from Infected Soft Tissues. *The Journal of Immunology*. 2011; 187: 6022–6031. DOI: 10.4049/jimmunol.1101385.
3. Goldmann O., Chhatwal G.S., Medina E. Immune Mechanisms Underlying Host Susceptibility to Infection with Group A Streptococci. *The Journal of Infectious Diseases*. 2003; 187: 854–861. DOI: 10.1086/368390.
4. Fieber C., Kovarik P. Responses of innate immune cells to group A Streptococcus. *Frontiers in Cellular and In-*

- fection Microbiology*. 2014; 4 (140): 1–7. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00140.
5. Kwinn L.A., Nizet V. How Group A Streptococcus circumvents host phagocyte defenses. *Future Microbiology*. 2007; 2 (1): 75–84. DOI: 10.2217/17460913.2.1.75.
 6. Pontus T., Johansson L., Low D.E., Gan B.S., Kotb M., McGeer A., Norrby-Teglund A. Viable group a streptococci in macrophages during acute soft tissue infection. *PLoS Medicine*. 2006; 3 (3): 371–379. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030053.
 7. Nobbs A.H., Lamont R.J., Jenkinson H.F. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2009; 73 (3): 407–450. DOI: 10.1128/MMBR.00014-09.
 8. Hamada S., Kawabata S., Nakagawa I. Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group A *Streptococcus pyogenes*. *The Proceedings of the Japan Academy, Series B Physical and Biology Science*. 2015; 91 (10): 539–559. DOI: 10.2183/pjab.91.539.
 9. Loof T.G., Goldmann O., Gessner A., Herwald H., Medina E. Aberrant inflammatory response to *Streptococcus pyogenes* in mice lacking myeloid differentiation factor 88. *The American Journal of Pathology*. 2010; 176 (2): 754–763. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090422.
 10. Harder J., Franchi L., Munoz-Planillo R., Park J.-H., Reimer T., Nunez G. Activation of the nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF- κ B Activation but Proceeds Independently of TLR signaling and P2X7 Receptor. *The Journal of Immunology*. 2009; 183: 5823–5829. DOI: 10.4049/jimmunol.0900444.
 11. Schommer N.N., Muto J., Nizet V., Gallo R.L. Hyaluronan Breakdown Contributes to Immune Defense against Group A Streptococcus. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289 (39): 26914–26921. DOI: 10.1074/jbc.M114.575621.
 12. Суворова М.А., Крамская Т.А., Суворов А.Н., Киселева Е.П. Инактивация гена белка M111 влияет на взаимодействие *Streptococcus pyogenes* с макрофагами мышей *in vitro*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 164 (9): 330–334. [Suvorova M.A., Kramskaya T.A., Suvorov A.N., Kiseleva E.P. Inactivation of M111 protein gene affects the interaction of *Streptococcus pyogenes* with mice macrophages *in vitro*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017; 164 (9): 330–334 (in Russ.)].
 13. Von Pawel-Rammingen U. Streptococcal IdeS and its impact on immune response and inflammation. *Journal of Innate Immunity*. 2012; 4: 132–140. DOI: 10.1159/000332940.
 14. O'Neill A.M., Thurston T.L.M., Holden D.W. Cytosolic replication of group a streptococcus in human macrophages. *Molecular Biology*. 2016; 7 (2): 1–16. DOI: 10.1128/mBio.00020-16.
 15. Hertzen E., Johansson L., Wallin R., Schmidt H., Kroll M., Rehn A.P., Kotb M., Morgelin M., Norrby-Teglund A. M1 protein-dependent intracellular trafficking promotes persistence and replication of *Streptococcus pyogenes* in macrophages. *Journal of Innate Immunity*. 2010; 2: 534–545. DOI: 10.1159/000317635.
 16. Barnett T.C., Liebl D., Seymour L.M., Gillen C.M., Lim J.Y., LaRock C.N., Davies M.R., Schulz B.L., Nizet V., Teasdale R.D., Walker M.J. The globally disseminated mlt1 clone of group a *Streptococcus* evades autophagy for intracellular Replication. *Cell Host & Microbe*. 2013; 14: 675–682. DOI: 10.1016/j.chom.2013.11.003.
 17. Hancz D., Westerlund E., Bastiat-Sempe B., Sharma O., Valfridsson C., Meyer L., Love J.F., O'Seaghdha M., Wessels M.R., Persson J.J. Inhibition of inflammasome-dependent interleukin 1 β production by streptococcal NAD $^{+}$ -Glycohydrolase: evidence for extracellular activity. *Molecular Biology*. 2017; 8 (4): e00756–007517. DOI: 10.1128/mBio.00756-17.
 18. Bastiat-Sempe B., Love J.F., Lomayeva N., Wessels M.R. Streptolysin O and NAD-glycohydrolase prevent phagolysosome acidification and promote group a *Streptococcus* Survival in macrophages. *Molecular Biology*. 2014; 5 (5): 1690–1714. DOI: 10.1128/mBio.01690-14.
 19. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998: 1–72.
 20. Cusumano Z.T., Caparon M.G.. Citrulline protects Streptococcus pyogenes from acid stress using the arginine deiminase pathway and the F1Fo-ATPase. *J. Bacteriol*. 2015; 197 (7): 1288–1296. DOI: 10.1128/JB.02517-14.
 21. Casiano-Colyn A., Marquis R.E. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ Microbiol*. 1988; 54 (6): 1318–1324.
 22. Starikova E.A., Sokolov A.V., Vlasenko A.Y., Burova L.A., Freidlin I.S., Vasilyev V.B. Biochemical and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22. *Biochemistry and Cell Biology*. 2016; 94 (2): 129–137. DOI: 10.1139/bcb-2015-0069.
 23. Degnan B.A., Fontaine M.C., Doebereiner A.H., Lee J.J., Mastroeni P., Dougan G., Goodacre J.A., Kehoe M.A. Characterization of an isogenic mutant of *Streptococcus pyogenes* Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein. *Infect Immun*. 2000; 68 (5): 2441–8. DOI: 10.1128/IAI.68.5.2441-2448.2000.
 24. Winterhoff N., Goethe R., Gruening P., Rohde M., Kalisz H., Smith H.E., Valentin-Weigand P. Identification and characterization of two temperature-induced surface-associated proteins of Streptococcus suis with high homologies to members of the arginine deiminase system of Streptococcus pyogenes. *J. Bacteriol*. 2002; 184 (24): 6768–6776. DOI: 10.1128/JB.184.24.6768-6776.2002.
 25. Xiong L., Teng J.L.L., Botelho M.G., Lo R.C., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Arginine metabolism in bacterial pathogenesis and cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci*. 2016; 17: 363. DOI: 10.3390/ijms17030363.
 26. Ryan S., Begley M., Gahan C.G., Hill C. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environ. Microbiol*. 2009; 11: 432–445. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01782.x.

27. Lee E.J., Pontes M.H., Groisman E.A. A bacterial virulence protein promotes pathogenicity by inhibiting the bacterium's own F1Fo ATP synthase. *Cell*. 2013; 154: 146–156. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.004.
28. Wu G., Morris S.M. Jr. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 1998; 336: 1–17.
29. Fang F.C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2: 820–832. DOI: 10.1038/nrmicro1004.
30. Старикова Э.А., Соколов А.В., Бурова Л.А., Головин А.С., Лебедева А.М., Васильев В.Б., Фрейдлин И.С. Роль аргининдеминазы пиогенного стрептококка в подавлении синтеза монооксида азота (NO) макрофагами. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8 (2): 211–218. [Starikova E.A., Sokolov A.V., Burova L.A., Golovin A.S., Lebedeva A.M., Vasil'ev V.B., Frejdlin I.S. The role of arginine deiminase of *Streptococcus pyogenes* in inhibiting the synthesis of nitrogen monoxide (NO) by macrophages. *Infection and Immunity*. 2018; 8 (2): 211–218 (in Russ.)]. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-2-211-218.
31. Miettinen M., Matikainen S., Vuopio-Varkila J., Pirhonen J., Varkila K., Kurimoto M., Julkunen I. Lactobacilli and streptococci induce Interleukin-12 (IL-12), IL-18, and Gamma Interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*. 1998; 66 (12): 6058–6062.
32. Latvala S., Mäkelä S.M., Miettinen M., Charpentier E., Julkunen I. Dynamitin inhibition interferes with inflammasome activation and cytokine gene expression in *Streptococcus pyogenes*-infected human macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*. 2014; 178: 320–333. DOI: 10.1111/cei.12425.
33. Zheng L., Khemlani A., Lorenz N., Loh J.M.S., Langley R.J., Proft T. Streptococcal 5'-nucleotidase A (S5nA), a novel *Streptococcus pyogenes* virulence factor that facilitates immune evasion. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290 (52): 31126–31137. DOI: 10.1074/jbc.M115.677443.
34. Kwinn L.A., Khosravi A., Aziz R.K., Timmer A.M., Doran K.S., Kotb M., Nizet V. Genetic characterization and virulence role of the RALP3/LSA locus upstream of the Streptolysin S operon in invasive M1T1 group A *Streptococcus*. *Journal of Bacteriology*. 2007; 189 (4): 1322–1329. DOI: 10.1128/JB.01256-06.
35. Herten E., Johansson L., Kansal R., Hecht A., Dahesh S., Janos M., Nizet V., Kotb M., Norrby-Teglund A. Intracellular *Streptococcus pyogenes* in human macrophages display an altered gene expression profile. *PLoS One*. 2012; 7 (4): 1–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0035218.
36. Brouwer S., Cork A.J., Ong C.Y., Barnett T.C., West N.P., McIver K.S., Walker M.J. Endopeptidase PepO regulates the SpeB cysteine protease and is essential for the virulence of Invasive M1T1 *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology*. 2018; 200 (8): e00654–006517. DOI: 10.1128/JB.00654-17.
37. Krishnan K.C., Mukundan S., Landero Figueroa J.A., Caruso J.A., Kotb M. Metal-mediated modulation of streptococcal cysteine protease activity and its biological implications. *Infection and Immunity*. 2014; 82 (7): 2992–3001. DOI: 10.1128/IAI.01770-14.
38. Aziz R.K., Kotb M. Rise and Persistence of Global M1T1 Clone of *Streptococcus pyogenes*. *Emerging Infectious Diseases*. 2008; 14 (10): 1511–1517. DOI: 10.3201/eid1410.071660.
39. Aziz R.K., Pabst M.J., Jeng A., Kansal R., Low D.E., Nizet V., Kotb M. Invasive M1T1 group A *Streptococcus* undergoes a phase-shift in vivo to prevent proteolytic degradation of multiple virulence factors by SpeB. *Molecular Microbiology*. 2004; 51 (1): 123–134. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03797.x.

Сведения об авторах

Фрейдлин Ирина Соломоновна, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, гл. науч. сотрудник, отдел иммунологии, Институт экспериментальной медицины; кафедра иммунологии, ПСПбГМУ имени академика И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург. ORCID iD 0000-0001-6637-3481.

Старикова Элеонора Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, отдел иммунологии, Институт экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург. ORCID iD 0000-0002-9687-7434.

Лебедева Александра Михайловна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, отдел иммунологии, Институт экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург. ORCID iD 0000-0002-4951-8447.

(✉) Фрейдлин Ирина Соломоновна, e-mail: irinaf-n@yandex.ru.

Поступила в редакцию 09.06.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Author information

Freydlin Irina S., DM, Professor, Corresponding Member RAS, Main Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Department of Immunology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-6637-3481.

Starikova Eleonora A., PhD, Senior Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation. Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9687-7434.

Lebedeva Aleksandra M., PhD, Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4951-8447.

(✉) Freydlin Irina S., e-mail: irinaf-n@yandex.ru.

Received 09.06.2018
Accepted 17.12.2018

УДК 578.28HIV:578.245
[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-119–130](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-119-130)

Аллельные варианты генов человека, затрагивающие внутриклеточный жизненный цикл ВИЧ и регулирующие иммунный ответ на ВИЧ-инфекцию

Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Гудима Г.О., Кофиади И.А.

*Институт иммунологии
Россия, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24*

РЕЗЮМЕ

В обзоре рассмотрены генетические факторы хозяина, влияющие на внутриклеточную часть жизненного цикла вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), а также регулирующие ВИЧ-специфический иммунный ответ. К ним относятся гены, которые кодируют белки, обеспечивающие репликацию вируса и формирование новых вирионов; гены, кодирующие противовирусные защитные белки; гены HLA и ряд других. Варианты этих генов и их сочетания вносят вклад в устойчивость или чувствительность индивидуума к ВИЧ-инфекции, влияют на патогенез заболевания, а также связаны с эффективностью антиретровирусной терапии.

Ключевые слова: гены, ВИЧ-инфекция, иммунный ответ, антиретровирусная терапия.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при написании статьи.

Для цитирования: Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Гудима Г.О., Кофиади И.А. Аллельные варианты генов человека, затрагивающие внутриклеточный жизненный цикл ВИЧ и регулирующие иммунный ответ на ВИЧ-инфекцию. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 119–130. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-119–130](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-119-130).

УДК 578.28HIV:578.245
[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-119–130](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-119-130)

Allelic variants of human genes affecting HIV intracellular life cycle and regulating immune response to HIV infection

Khaitov R.M., Alexeev L.P., Gudima G.O., Kofiadi I.A.

*Institute of Immunology
24, Kashirskoye Sh., Moscow, 115478, Russian Federation*

ABSTRACT

Host genetic factors influencing the intracellular part of HIV live cycle and regulating of HIV-specific immune response are reviewed. Its include genes coding proteins which support viral replication and assembly of new virions, genes coding antiviral defense proteins, HLA genes and some others. Variants of

✉ Гудима Георгий Олегович, e-mail: goudima@mail.ru.

these genes and its compositions affect individual susceptibility/resistance to HIV infection, influence the pathogenesis of the disease and also associate with efficacy of antiretroviral therapy.

Key words: genes, HIV, immune response, antiretroviral therapy.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

For citation: Khaitov R.M., Alexeev L.P., Gudima G.O., Kofiadi I.A. Allelic variants of human genes affecting HIV intracellular life cycle and regulating immune response to HIV infection. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 119–130. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-119-130>.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, ЗАТРАГИВАЮЩИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ВИЧ-1

Внутри клетки-мишени вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) 1 взаимодействует с многочисленными белками человека. Большинство из них необходимы для поддержания репликации вируса, некоторые выступают в роли антивирусных факторов. Среди генов человека, продукты которых могут выступать в качестве кофакторов для ВИЧ-1, выявлены варианты, ассоциированные с патогенезом ВИЧ-инфекции [1–4].

Ген опухолевой чувствительности

Ген опухолевой чувствительности (tumor susceptibility gene 101, *TSG101*) кодирует одноименный белок, который собирается в высокомолекулярный комплекс ESCRT-1. Он содержит домен связывания со статином и принимает участие в формировании митотического веретена деления, стабилизации генома, трансактиваии транскрипции, регулировании уровня MDM2 и p53, формировании эндосом. Взаимодействие N-концевого участка белка TSG101 с белком Gag вируса критично для формирования новых вирусных частиц. Сверхэкспрессия TSG101 заметно ингибирует формирование вирионов ВИЧ-1. В 5'-регионе гена *TSG101* расположены два сцепленных полиморфизма: -183T→C (rs2292179) и +181→C (rs1395319). Различные сочетания этих точечных замен в генотипе ВИЧ-инфицированных пациентов ассоциированы как со снижением вирусной нагрузки, замедлением потери CD4⁺-Т-клеток и, соответственно, с замедлением прогрессии заболевания, так и с ускорением прогрессии ВИЧ-инфекции в синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) [5].

Ген пептидилпролил-изомеразы А

Ген пептидилпролил-изомеразы А (*PPIA*) расположен на хромосоме 7 (7p13). Он кодирует цитоплазматический белок циклофилин А (СурА),

который важен для пространственной укладки молекул капсидного белка вириона и модулирует процессинг продуктов гена *gag*. СурА включается в вирионы ВИЧ и способствует «разделению» вируса после его проникновения в клетку [6]. В регуляторных областях гена *PPIA* расположено несколько полиморфизмов, ассоциированных с истощением популяции CD4⁺-Т-клеток и, как следствие, с повышенной восприимчивостью к ВИЧ-инфекции [7]. Полиморфизм -1650A→G (rs118096718) в промоторной области гена *PPIA* ассоциирован с пониженной репликацией вируса *ex vivo* и замедлением развития ВИЧ-инфекции *in vivo* [3]. Полиморфизм rs6850G связан с усилением репликации ВИЧ-1 в результате повышения экспрессии СурА. Полиморфизмы SNP3 и SNP4 в промоторной области гена *PPIA* ассоциированы с увеличением скорости потери CD4⁺-Т-клеток и ускорением прогрессии заболевания. Полиморфизм SNP5 в районе 5'-UTR ассоциирован с усиленной репликацией вируса *ex vivo*. Он чаще обнаруживался у ВИЧ-инфицированных лиц, чем у серонегативных индивидуумов, часто контактирующих с ВИЧ (High Exposed Permanently Seronegative, HEPS) [8]. Таким образом, полиморфизмы гена *PPIA* связаны с генетически обусловленной чувствительностью к ВИЧ-инфекции и играют важную роль в патогенезе заболевания.

Ген *CUL5*

Ген *CUL5* расположен на хромосоме 11 (11q22.3) и кодирует белок куллин-5 (cullin-5, *CUL5*). *CUL5* входит в состав E3-убиквитинлигазного комплекса SOCS/BC-box/eloBC/*CUL5*/RING, который осуществляет убиквитинилирование белков и способствует их разрушению в протеасомах [9]. *CUL5* совместно с клеточным белком core binding factor β (CBFβ) является кофактором белка Vif ВИЧ-1, который связывает противовирусный белок APOBEC3 клетки-хозяина и стимулирует его разрушение по убиквитин-зависимому

пути, что приводит к блокированию клеточной защиты от вируса [10]. Ряд полиморфизмов гена *CUL-5* связан со скоростью развития ВИЧ-инфекции. Полиморфизмы rs7117111 и rs11212495 влияют на связывание транскрипционных факторов и ассоциированы с ускорением развития СПИДа у афроамериканцев. Полиморфизм rs7103534 ассоциирован с замедлением прогрессии ВИЧ-инфекции в популяции американцев европейского происхождения [11].

Кроме белков, которые необходимы для эффективной репликации ВИЧ-1, геном человека кодирует молекулы, обладающие антиретровирусной активностью. Мощными ингибиторами репликации ретровирусов являются белки TRIM5α и APOBEC3.

Ген *TRIM5*

Ген *TRIM5* кодирует белки семейства TRIM, включающего несколько десятков белков. Белок tripartite motive 5α (TRIM5α) является компонентом врожденной защиты против ретровирусов [12]. Он ограничивает вход ВИЧ в клетку-мишень, взаимодействуя с ретровирусным капсидом и способствуя его преждевременной разборке [13]. Полиморфизмы H43Y и R136Q гена *TRIM5* человека ассоциированы с различной антиретровирусной активностью белка TRIM5α [14]. Вариант TRIM5α 43Y ассоциирован со снижением антивирусной активности *in vitro*, а у ВИЧ-инфицированных индивидуумов, имеющих гомозиготный генотип 43Y/43Y, наблюдалось ускорение прогрессии заболевания по сравнению с носителями гетерозиготного генотипа 43Y/43H или гомозиготного генотипа 43H/43H. Протективный эффект генотипа 136Q обнаруживался после появления Х4-вариантов вируса у ВИЧ-инфицированных индивидуумов. В наивных CD4⁺-Т-клетках, которые являются мишенями Х4-штаммов ВИЧ-1, обнаруживалась значительно более высокая экспрессия TRIM5α, чем в CD4⁺-Т-клетках памяти. Сочетание аллеля 136Q с аллелем -2GG в 5'-UTR ассоциировано с ускоренной прогрессией заболевания [14]. Таким образом, полиморфизмы гена *TRIM5* влияют на клиническое течение заболевания [3].

Гены *APOBEC3*

Гены *APOBEC3* кодируют семейство цитоплазматических белков apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide (*APOBEC3*), участвующих в химических модификациях ДНК и РНК [15]. Ген *APOBEC3G* кодирует белок APOBEC3G, который обладает дезаминазной активностью:

удаляет аминогруппу из цитозина (C), превращая его в урацил (U). APOBEC3G проникает в новообразованные вирионы и вызывает массовую замену цитозина на урацил непосредственно после синтеза первой нити провирусной ДНК. Это приводит к возникновению гипермутаций G→A при синтезе второй цепи, что ограничивает интеграцию мутантной вирусной ДНК в хромосомную ДНК и подавляет репликацию вируса в клетке-мишени. Ряд полиморфизмов гена *APOBEC3G* ассоциирован со скоростью развития заболевания и риском ВИЧ-инфекции. Мутация H186R (rs8477832) наиболее часто наблюдается в афроамериканской популяции и ассоциирована с ускоренной прогрессией ВИЧ-инфекции в СПИД. Полиморфизмы, расположенные в области интрона, ассоциированы с ускорением прогрессии ВИЧ-инфекции в СПИД (197193C /rs3736685/ и 199376C /rs2294367/) и с повышенным риском ВИЧ-инфекции (C40693E) [16]. С повышением риска ВИЧ-инфекции связана делеция гена *APOBEC3B* (мутация Δ3B/Δ3B) [17]. Полиморфизмы, ассоциированные с чувствительностью к ВИЧ-инфекции, выявлены в гене *APOBEC3H*, кодирующем одноименный белок, который, как и APOBEC3G, способен значительно ограничивать репликацию ВИЧ-1. Полиморфизмы rs139292 (N15del) и rs139297 (G105R) ассоциированы с повышенной чувствительностью к ВИЧ-инфекции. Гаплотип A3H-hapB, кодирующий более стабильную форму белка, связан с пониженным риском ВИЧ-инфекции и чаще выявляется в группе LTNP [18]. Полиморфизм rs2076101G (231V) гена *APOBEC3F* значимо коррелирует с пониженным уровнем равновесной вирусной нагрузки и замедлением развития СПИДа. Протективный эффект гаплотипа 231V особенно выражен у ВИЧ-инфицированных пациентов, страдающих пневмоцистной пневмонией, – развитие оппортунистической инфекции замедляется [19].

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В РЕГУЛЯЦИЮ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ВИЧ-ИНФЕКЦИЮ

Гены *HLA* класса I

Гены *Human leucocyte antigens (HLA)* класса I расположены на коротком плече хромосомы 6. Комплекс HLA класса I включает гены *HLA-A*, *HLA-B* и *HLA-C*, характеризуется необычайным аллельным разнообразием и является наиболее полиморфным в системе HLA. Выявлены устойчивые ассоциации между отдельными аллелями (группами аллелей) HLA класса I и уровнем

индивидуального иммунного ответа на ВИЧ-инфекцию.

Существует значительная вариабельность в индивидуальной чувствительности к ВИЧ-инфекции и в клинической картине заболевания. Одним из выраженных и в значительной степени необъясненных различий является уровень циркулирующего в крови вируса в асимптоматический период, предшествующий развитию СПИДа. Он обозначается как равновесная вирусная нагрузка (viral set-point) и может варьировать от 4 до 5 lg. С использованием стратегии полногеномной ассоциации сделана попытка выявить генетические особенности, которые лежат в основе этих различий. В результате анализа образцов, полученных от более 30 000 пациентов, выявлены полиморфизмы, с которыми ассоциировано около 15% вариабельности уровня равновесной вирусной нагрузки во время асимптоматического периода ВИЧ-инфекции [1, 3].

Значимые полиморфизмы, связанные с уровнем вирусной нагрузки и контролем ВИЧ-инфекции, обнаружены в комплексе HLA. Индивидуальные аллели HLA класса I, ассоциированные с замедленной прогрессией ВИЧ-инфекции в СПИД, оказывают существенное влияние на CD8⁺-Т-клеточный иммунный ответ в период первичной инфекции, и этот эффект имеет иммунодоминантный характер [20]. Аллели HLA класса I отличаются по их вкладу в ВИЧ-специфический CD8⁺-Т-клеточный иммунный ответ из-за предпочтительного распознавания эпитопов цитотаксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ) вируса. Существует иерархия иммуногенности различных белков ВИЧ-1 (Nef > Gag > Pol > Env > Vif > Rev > Vpr > Tat > Vpu) и распознавания эпитопов эффекторными CD8⁺-ЦТЛ [21]. По данным ряда исследований, «протективные» аллели HLA класса I в основном представляют ЦТЛ-эпитопы капсидного белка Gag. Показано, что молекулы HLA-B играют доминантную роль в отборе анти-вирусных ЦТЛ по сравнению с другими молекулами HLA класса I [22]. Эти различия частично могли быть объяснены более высоким разнообразием аллелей HLA-B по сравнению с HLA-A и другими. HLA-B*27, HLA-B*57, HLA-B14, HLA-B44 и HLA-B51 имеют сильную ассоциацию с замедленной прогрессией ВИЧ-инфекции в СПИД, в то время как аллели HLA-B*35, HLA-B*53, HLA-A29 и HLA-B22 ассоциированы с быстрым развитием СПИДа [23]. Рассмотрим основные варианты генов HLA класса I, ассоциированных с вирусной нагрузкой и развитием ВИЧ-инфекции (СПИДа).

Аллельные варианты HLA-B*57

Установлена ассоциация аллелей B*57, B*58 и B*63 с низкой вирусной нагрузкой и замедлением развития СПИДа в различных популяциях [1, 3, 24]. Аллели HLA-B*57 связывают пептиды, включающие гидрофобные аминокислотные остатки (триптофан, фенилаланин) в С-концевой части. Протективный эффект аллелей B*57 наблюдается на ранних этапах инфекции. Аллели HLA-B*57 оказывают сильное селекционное действие и способствуют быстрой мутации вируса, что может приводить к снижению его репликативного потенциала и падению вирусной нагрузки [23]. Большинство пациентов, несущих аллели HLA-B*57, имеют менее выраженные симптомы заболевания. Обнаружено, что у элитных контроллеров, несущих аллели HLA-B*57, происходит отбор редких мутантных вариантов по гену gag, которые имеют пониженную жизнеспособность, но индуцируют сильный ЦТЛ-ответ [25]. В частности, Gag-эпитоп KF11 может представлять молекулами HLA-B*5701 и B*5703, которые отличаются между собой только по двум аминокислотным остаткам в положениях 114 и 116 вблизи кармана F [26]. У ВИЧ-1 субтипа В этот эпитоп имеет ограниченное количество эскаре-вариантов, образующихся под влиянием HLA-B*5701. У ВИЧ-1 субтипа С этот эпитоп характеризуется значительным разнообразием последовательностей в популяциях, проживающих в Африке, где аллель HLA-B*5703 является основным вариантом. Таким образом, минимальные различия последовательностей молекул HLA могут привести к образованию полностью различных наборов мутантных форм вируса.

Аллель HLA-B*5701 (rs2395029, HCP5 T>G) связан с 9,6% общей вариабельности равновесной вирусной нагрузки и имеет наиболее выраженную ассоциацию с контролем ВИЧ-инфекции. Наличие единичной копии аллеля HLA-B*5701 приводит к снижению вирусной нагрузки более чем на 1 lg, что связано с замедлением прогрессии заболевания [1, 3]. У ВИЧ-инфицированных пациентов, несущих аллель HLA-B*5701, супрессия виремии может проявляться в виде недетектируемой вирусной нагрузки даже после того, как произойдет мутация ВИЧ-1, которая позволяет вирусу уходить от действия ЦТЛ [27]. ВИЧ-инфицированные пациенты с HLA-B*5701 имеют меньшую частоту проявления симптомов во время острой ВИЧ-1-инфекции [20], что позволяет предполагать наличие контроля ВИЧ-1 до того, как развивается максимально выраженный ЦТЛ-ответ [3]. Наиболее часто этот аллель

встречается в популяциях европеоидов и коренных жителей Африки. По результатам полногеномных исследований для аллеля HLA-B*5701 показана одна из самых сильных ассоциаций с контролем развития ВИЧ-инфекции в группе долговременных непрогрессоров (long term non-progressors, LTNP) [3, 28].

Наличие аллеля HLA-B*5701 ассоциировано с повышенной чувствительностью к абакавиру (нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ-1). Применение этого препарата у пациентов с генетически обусловленной гиперчувствительностью может привести к летальному исходу [29]. Синдром гиперчувствительности к абакавиру (abacavir hypersensitivity syndrome, AHS) имеют 2–8% ВИЧ-инфицированных пациентов [30]. AHS развивается в течение 10–40 сут после начала антиретровирусной терапии (АРТ) с применением абакавира. Абакавир вызывает специфический HLA-B*5701-рестриктивный CD8⁺-Т-клеточный иммунный ответ, опосредованный классической презентацией антигена с участием HLA класса I [31]. У пациентов, чувствительных к абакавиру, обнаружена сильная ассоциация AHS и гаплотипа AH57.1 (MHC Ancestral Haplotype 57.1), несущего аллели HLA-B*5701-DRB1*07 [32]. Также у этих индивидуумов с высокой частотой выявляется nsSNP Hsp70-Hom (HspA1L), имеющий замену M493T в пептид-связывающей субъединице. Гиперчувствительность к абакавиру проявляется при одновременном наличии аллеля HLA-B*5701 и гаплотипа Hsp70-Hom M493T [33]. Специфичность распознавания абакавира связана с аминокислотными остатками 116 и 114 кармана F пептид-связывающей впадины молекулы HLA-B*5701 [26]. Прогностическая значимость наличия аллеля HLA-B*5701 и клиническая важность этого показателя для диагностики AHS подтверждены в нескольких когортных исследованиях [34]. На основе этих исследований в США и Западной Европе в руководства по лечению ВИЧ-инфекции было включено обязательное тестирование пациентов на наличие аллеля HLA-B*5701 до назначения терапии с использованием абакавира. В европейской популяции аллель HLA-B*5701 имеет сильную связь с минорным аллелем G, соответствующим полиморфизму rs2395029 в гене *HCP5* локуса MHC. Ряд исследователей предлагают использование генотипирования по *HCP5* в качестве альтернативного маркера AHS [30].

Обнаружены и другие генетические ассоциации с эффективностью и токсичностью антиретровирусных препаратов. К ним относятся ассоциа-

ции HLA-DRB1*0101 и Cw8 с чувствительностью к невирапину (нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы, ННИОТ), CYP2B6*6 – с усиленным восстановлением иммунной системы в ответ на ННИОТ, а также ассоциация CYP2B6*6 с ускоренным выведением ингибиторов протеазы ВИЧ-1 (секвинавира и индинавира) [35]. Доказано эффективное ограничение развития ВИЧ-инфекции аллелями HLA-B*27 и HLA-B*44 [36].

Аллельные варианты HLA-B*27

Аллель HLA-B*27, частота встречаемости которого составляет 4–6%, значимо ассоциирован со скоростью развития СПИДа. Субтипы HLA-B27 отличаются от наиболее распространенного «прототипа» HLA-B*2705 по одному или более аминокислотным остаткам. Наличие Glu²⁻ в положении 45 обуславливает отрицательный заряд кармана «В» молекулы HLA-B*2705, что приводит к связыванию пептидов, содержащих положительно заряженные аминокислотные остатки, например Arg²⁺ в положении P2. Эта особенность ассоциирована с замедленным развитием СПИДа. Большинство вариантов HLA-B*27 связывают пептиды, имеющие Arg в положении P2, а аллель B*2701 способен также связывать пептиды, которые в положении P2 содержат Gln²⁺. Аллели B*2705, B*2703 и B*2710 способны представлять пептиды с основными, алифатическими или ароматическими С-концевыми аминокислотными остатками, а аллели B*2701, B*2702, B*2706, B*2707 и B*2709 представляют только пептиды с С-концевыми ароматическими или алифатическими аминокислотными остатками.

Исследование кристаллической структуры молекул, кодируемых HLA-B*27, показало, что цистеин в положении 67, а также глутамин в положении 45 и треонин в положении 24 связаны со специфичностью кармана «В» сайта связывания пептидов. Предполагается, что аллотипы B*27 оказывают умеренное влияние на ЦТЛ-опосредованное давление отбора на ВИЧ-1. Это приводит к относительно медленной элиминации вируса и торможению образования escape-мутантов [3]. Таким образом, протективный эффект, опосредованный аллелями B*27, проявляется на относительно поздних этапах ВИЧ-инфекции. В процессе адаптации вируса происходит образование ЦТЛ-escape-мутантов, которые способны уходить от действия аллелей B*27. Обнаружены циркулирующие штаммы ВИЧ-1, имеющие варианты Gag-p24 KK10, R264G и дополнительную компенсаторную мутацию E260D вне этого эпитопа [37]. Таким образом,

ВИЧ-инфицированные индивидуумы, несущие аллели HLA-B*27, не защищены от развития СПИДа в будущем.

Аллельные варианты HLA-B*35

Описано более 110 молекулярных субтипов HLA-B*35, которые разделены на две основные группы в соответствии со способностью их продуктов связывать пептиды. Группа B*35 Р_у состоит из аллелей, которые связывают эпитопы, содержащие пролин в положении 2 и тирозин в положении 9, что соответствует карману «F». Группа аллелей B*35 Р_х связывает пептиды, содержащие пролин в положении 2 и остатки, отличные от тирозина, в положении 9. Молекулы HLA-B*35 Р_х и Р_у различаются в первую очередь по аминокислотным остаткам в положении 116, которые формируют основание пептид-связывающего кармана «F», определяют размер остатков С-концевого участка пептида и непосредственно взаимодействуют с остатками связываемого пептида в положении 9. Изменения в этом положении важны при определении преимущественного связывания пептидов, а также оказывают влияние на процесс их переноса в эндоплазматическом ретикулуле. Аллели HLA-B*35Р_х (включая B*3502, B*3503, B*3504 и B*5301) и HLA-B*18 ассоциированы с быстрой прогрессией ВИЧ-инфекции в СПИД [38]. Предполагается, что эпитопы ВИЧ-1, распознаваемые аллелями B*35Р_х, действуют как «иммунологические ловушки» и уже на ранних этапах инфекции обуславливают индукцию ЦТЛ, которые не способны к эффективной деструкции ВИЧ-инфицированных клеток [23]. В пользу этого свидетельствует тот факт, что у ВИЧ-инфицированных носителей аллелей HLA-B*35Р_у вирусная нагрузка снижается значительно эффективнее, чем у носителей аллелей HLAB*35Р_х, хотя в обоих случаях имеют место сходные характеристики клеточного иммунного ответа [3]. Популяционный анализ распределения аллелей HLA-B27, B57 и B35 показал, что наибольшую ассоциацию с риском развития СПИДа у ВИЧ-инфицированных индивидуумов имеют аллели HLA-B35. Риск, связанный с наличием определенных аллелей HLA, является только частью общего генетического риска. Восприимчивость к ВИЧ-инфекции (СПИДу) связана с мультигенной регуляцией, и каждый фактор хозяина вносит свой вклад в индивидуальную чувствительность к этому заболеванию.

Неклассические гены HLA

Молекулы HLA класса I, кодируемые генами *HLA-E* и *HLA-G*, являются лигандами ингибирующих рецепторов CD94/NKG2A и KIR2DL4 соот-

ветственно. Аллели HLA-E*0103 и HLA-G*0105N ассоциированы с потенциально низкой аффинностью ингибирующих рецепторов НК-клеток и пониженным риском ВИЧ-инфекции, а аллель HLA-G*010108 – с усилением восприимчивости к ВИЧ-инфекции [39]. Полиморфизмы HLA-E и HLA-G способны независимо и синергично влиять на восприимчивость к гетеросексуальной передаче ВИЧ-инфекции. Эти данные поддерживают представления о роли НК-клеток в ограничении передачи ВИЧ-инфекции и развития СПИДа и позволяют предполагать, что в этом процессе могут параллельно участвовать ингибирующие НК-рецепторы и HLA-лиганды.

Супертипы и гаплотипы HLA

Супертипы HLA представляют собой группы аллелей, связывающих перекрывающиеся пептиды. Супертип HLA класса I HLA-A*02/*6802 ассоциирован с защитой от инфекции ВИЧ-1 субтипа С и снижением вертикальной передачи ВИЧ-1 [40]. Аллели HLA-A*0205/*6802, принадлежащие к тому же супертипу, чаще выявляются в группе HEPS [41]. Супертип HLA-B7, включающий аллели B*0702-5, *1508, *3501-3, *5101, *5301, *5401, *5501-02, *5601, *5602, *6701 и *7801 (со специфичностью к пролину в положении 2 и остатками AILMVFWY в С-концевой части связываемого пептида) ассоциирован с высокой вирусемией, относительно слабым ЦТЛ-ответом и ускоренным развитием СПИДа у кавказоидов, инфицированных ВИЧ-1 субтипа В, но не у африканцев, инфицированных ВИЧ-1 субтипа С [42]. HLA-супертипы A3 (*0301, *1101, *3101, *3301, *6801) и B7 ассоциированы с восприимчивостью к ВИЧ-инфекции и развитием СПИДа у ВИЧ-инфицированных индивидуумов в Юго-Восточной Азии [43]. В частности, аллель A*1101 рестриктирует ЦТЛ-эпитопы белка Nef в группах HEPS [38].

Значимый полиморфизм rs9264942 располагается в 5'-районе гена *HLA-C* на 156 кб ближе к теломере по отношению к гену *HCP5*. С этим полиморфизмом связано 6,5% общей вариабельности равновесной вирусной нагрузки. Полиморфизм rs9264942 также в значительной степени ассоциирован с различиями уровня экспрессии *HLA-C* [1, 3]. Наличие протективного аллеля приводит к более низкой равновесной вирусной нагрузке и ассоциировано с повышенной экспрессией гена *HLA-C*. Эта сильная и независимая ассоциация с уровнем экспрессии *HLA-C* позволяет предполагать, что регуляция уровня экспрессии классических генов *HLA* оказывает влияние на контроль вируса.

Важные возможности для терапевтических и профилактических разработок может представлять участие HLA-С в контроле репликации ВИЧ-1. Регуляторный белок Nef ВИЧ-1 избирательно понижает экспрессию HLA-A и HLA-B, но не HLA-C на поверхности инфицированных клеток. Молекулы HLA-C способны представлять вирусные пептиды CD8⁺-ЦТЛ и, соответственно, вносят вклад в ограничение репликации ВИЧ-1 [44]. HLA-С-опосредованное ограничение репликации вируса может быть важным элементом контроля ВИЧ-инфекции при специфическом генетическом фоне, а устойчивость экспрессии HLA-С к снижению, вызываемому белком Nef, перспективна для терапевтических стратегий, направленных на активацию HLA-С-опосредованного иммунного ответа.

В контроль ВИЧ-инфекции вовлечен ряд HLA-гаплотипов [42, 45]. В частности, гаплотипы AH44.1 (A2-B*44.02-DR4), AH35.2 (A11-B35-DR1), AH7.1 (A1-B*5701-DR7) ассоциированы с устойчивостью к ВИЧ-инфекции, гаплотипы AH8.1 (A1-B8-DR3), AH44.2 (A29-B44-DR7), AH35.1 (Aх-B35-DR11) – с восприимчивостью к ВИЧ-инфекции.

Молекулы, кодируемые генами *HLA* класса I, представляют широкий спектр эпитопов ВИЧ-1. Количество идентифицированных ЦТЛ-эпитопов ВИЧ-1 превысило 1 600 [46]. Гомозиготность по *HLA-A*, *HLA-B* и (или) *HLA-C* ограничивает репертуар представляемых антигенов и ассоциирована с ускорением прогрессии заболевания [1, 3, 28].

Гены *HLA* класса II

Генам *HLA* класса II принадлежит важнейшая роль в регуляции иммунного ответа. Центральную роль в развитии иммунного ответа против ВИЧ-1 играют CD4⁺-Т-клетки. Молекулы, кодируемые генами *HLA* класса II, обеспечивают представление антигенных пептидов CD4⁺-Т-лимфоцитам-хелперам, которые способствуют образованию антиген-специфических антителопродуцирующих В-клеток и CD8⁺-ЦТЛ. Регулируемый генами *HLA* класса II ВИЧ-специфический CD4⁺-Т-клеточный иммунный ответ является важным фактором контроля репликации вируса [3, 47, 48]. Идентифицировано более 460 эпитопов ВИЧ-1, представляемых молекулами *HLA* класса II. По сравнению с CD8⁺-Т-клетками и соответствующими ассоциациями генов *HLA* класса I, относительно мало известно о генах *HLA* класса II, которые способны индуцировать протективный CD4⁺-Т-клеточный ответ и ограничивать вирус-

ную инфекцию. Установлен ряд аллелей генов *HLA* класса II, которые связаны с устойчивостью или чувствительностью к ВИЧ-инфекции, а также оказывают существенное влияние на развитие заболевания.

Аллели *HLA-DRB1*01* ассоциированы с устойчивостью к ВИЧ-инфекции [40]. Эта ассоциация была независима от аллелей *HLA-A2/6802*, ассоциированных со сниженным риском ВИЧ-инфекции. Исследование, проведенное в когорте ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих АРТ на ранних этапах инфекции, выявило значимую ассоциацию *HLA-DRB1*13* с подавлением виремии после АРТ [49]. Исследование перинатальной трансмиссии ВИЧ-1 показало высокую частоту встречаемости *DRB1*03* среди инфицированных и *DRB1*15* среди неинфицированных детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей [48].

У ВИЧ-инфицированных пациентов аллели *HLA-DRB1*0902*, *DRB1*13*, *DQB1*030103*, *DQB1*050201* и *DQB1*0602* выявлялись значительно чаще, а аллели *HLA-DRB1*01*, *DQB1*0203*, *DQB1*030101*, *DQB1*050301* и *DQB1*060101* обнаруживались существенно реже по сравнению с неинфицированными донорами. Гаплотипы *DRB1*150101-DQB1*060101*, *DRB1*030101-DQB1*020101* и *DRB1*070101-DQB1*0202* у ВИЧ-инфицированных индивидуумов выявлялись редко, а гаплотипы *DRB1*0902-DQB1*030103* и *DQA1*010201-DQB1*0602*, напротив, встречались чаще. Гаплотипы *DQA1*0504-DQB1*0201*, *DQA1*010201-DQB1*0201*, *DQA1*0402-DQB1*0402* и *DQA1*0402-DQB1*030101* были обнаружены только у ВИЧ-инфицированных индивидуумов. У носителей этих гаплотипов наблюдалась быстрая сероконверсия [50].

В когортных исследованиях обнаружено, что аллели *HLA-DRB1*010101*, *DRB1*010201*, *DRB1*1102*, *DQB1*050301*, *DQB1*0603*, *DQB1*0609* и гаплотипы *DQA1*010201-DQB1*0603* и *DRB1*1102-DRB3*020201* ассоциированы с устойчивостью, а аллели *DRB1*030201*, *DRB1*070101*, *DRB1*13*, *DRB1*1503*, *DRB5*010101* и гаплотипы *DRB1*070101-DRB4*01010101* и *DRB1*1503-DRB5*01010101* – с чувствительностью к ВИЧ-инфекции. Эти ассоциации независимы от *HLA-DRB1*01*, *HLA-A2/6802* и *HLA-A*2301*. У кавказоидов аллели *DQB1*0602* и *DQB1*0603* ассоциированы с чувствительностью к ВИЧ-инфекции, а аллель *DQB1*03032* – со сниженным риском ВИЧ-инфекции. У афроамериканцев аналогичные ассоциации не обнаружены. Аллели *DQB1*0201* и *DQB1*0605* с более высокой частотой обнаруживались у ВИЧ-инфицированных афроамериканцев,

аллель HLA-DRB1*04 чаще выявлялся у ВИЧ-инфицированных кавказоидов [40, 47, 50]. Таким образом, ассоциация аллелей *HLA* класса II с устойчивостью и чувствительностью к ВИЧ-инфекции отличается в различных этнических группах и популяциях.

Гены *KIR*

Кластер генов *KIR* локализован на хромосоме 19 (19q13.4) и включает в себя 12 генов. Эти гены кодируют иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток (killer cell immunoglobulin-like receptors, *KIR*) (CD128). *KIR* экспрессированы на поверхности НК-клеток, которые являются центральным компонентом системы врожденного иммунитета и играют важную роль в противовирусной и противоопухолевой защите. *KIR* представляют собой набор полиморфных вариантов основного локуса и контролируют активацию или ингибирование активности НК-клеток за счет распознавания специфических лигандов *HLA* класса I. ВИЧ-1 вызывает снижение экспрессии *HLA-A* и *HLA-B*, что приводит к нарушению НК-клеточного иммунного ответа. Рецепторы *KIR* взаимодействуют с молекулами *HLA* и детектируют изменения их количества, в том числе при опухолевой трансформации или вирусной инфекции. Клетки, на которых снижена экспрессия молекул *HLA* класса I, разрушаются НК-клетками. Определенные сочетания *HLA-KIR* способны оказывать влияние на течение ВИЧ-инфекции [51].

Опосредованный НК-клетками цитолиз происходит только тогда, когда активационные сигналы преобладают над ингибиторными. Ингибирующие и активирующие *KIR* содержат два или три внешних Ig-подобных домена (2D и 3D) и удлиненные (2DL и 3DL) или укороченные (2DS и 3DS) цитоплазматические участки соответственно. Ингибирующие *KIR* – *KIR2DL2* и *KIR2DL3* – связываются с *HLA-Cw* группы 1 (*HLA-C1*), которые имеют остаток аспарагина в положении 80, а *KIR2DL1* связывается с *HLA-Cw* группы 2 (*HLA-C2*), имеющими в этом положении лизин. Группа *HLA-C1* включает лиганды *HLA-C*01*, *C*03*, *C*07* и *C*08*, которые соединяются с рецепторами *KIR2DL2*, *2DL3* и *2DS2*. Группа *HLA-C2* включает лиганды *HLA-C*02*, *C*04*, *C*05* и *C*06*, связывающиеся с рецепторами *KIR2DL1* и *2DS1* [52]. *KIR3DL1* связывают молекулы *HLA-B* с эпитопом Bw4, специфичным к пяти различным аминокислотам в положениях 77–83. Соединения альтернативного эпитопа Bw6 с молекулами *KIR* не обнаружено.

В когорте HEPS с высокой частотой выявлялись ингибиторные рецепторы *KIR2DL2/KIR2DL3* в гетерозиготном состоянии и *KIR3DL1* в гомозиготном состоянии при отсутствии их лигандов *HLA-C1* и *HLA-Bw4* соответственно [53]. Напротив, у ВИЧ-инфицированных индивидуумов *KIR* и их лиганды выявлялись вместе, например *KIR2DL3* (в гомозиготном состоянии) и *HLA-C1*, или *KIR3DL1* и аллели *HLA-Bw4*. Для HEPS характерно преимущественное наличие гаплотипов АВ, включающих большее количество активирующих *KIR*, а для ВИЧ-инфицированных индивидуумов – более частое присутствие гаплотипов АА, включающих меньшее количество активирующих *KIR*. Отсутствие *HLA*-лигандов, ингибирующих *KIR*, может снижать порог активации НК-клеток, что приводит к усилению цитотоксического действия НК-клеток и раннего лизиса ВИЧ-инфицированных клеток [26].

KIR3DL1 и *KIR3DS1* являются аллельными вариантами одного гена. Экспрессия активирующего рецептора *KIR3DS1* ассоциирована с быстрой прогрессией в СПИД, но только при отсутствии аллелей *HLA*, кодирующих Ile в положении 80 (*HLA-B80Ile*). Напротив, в случае совместной экспрессии *KIR3DS1* и Bw80Ile наблюдался синергичный протективный эффект [54]. Коэкспрессия активирующего аллеля *KIR3DS1* и аллеля *HLA-B*, кодирующего молекулу *HLA-Bw4-80Ile*, ассоциирована с низким уровнем вирусной нагрузки и замедленной прогрессией ВИЧ-инфекции в СПИД. Коэкспрессия *KIR3DS1* и *HLA-Bw4-80Ile* сопровождалась усилением эффекторной функции НК-клеток в начале ВИЧ-инфекции [55]. При отсутствии *KIR3DS1* не наблюдалось какого-либо влияния аллеля *HLA-Bw4-80Ile* на развитие СПИДа. Напротив, при отсутствии *HLA-Bw4-80Ile* аллель *KIR3DS1* ассоциирован с ускоренным развитием СПИДа [54, 56]. Коэкспрессия *KIR3DL1* и *HLA-B*57* ассоциирована с замедленной прогрессией ВИЧ-инфекции в СПИД [36].

KIR3DL1 и *KIR3DS1* могут играть определенную роль в восприимчивости к ВИЧ-инфекции [57]. Сочетание *KIR3DS1(3DS1/3DL1)-HLA-Bw4* значительно чаще обнаруживалось в группе HEPS, чем у их дискордантных партнеров и ВИЧ-инфицированных пациентов, т. е. было ассоциировано со сниженным риском ВИЧ-инфекции. Напротив, гомозиготность *KIR3DL1/KIR3DL1* выявлялась значимо реже у HEPS, чем у их дискордантных партнеров и ВИЧ-инфицированных пациентов. Частота встречаемости *HLA-A*32* и *HLA-B*44* (оба – аллели Bw4) также была выше у HEPS, чем у их дискордантных

партнеров и ВИЧ-инфицированных пациентов [58]. Коэкспрессия KIR3DL1 и HLA-B*57 ассоциирована со сниженным риском ВИЧ-инфекции в группе HEPs [57].

Другие гены

Группа полиморфизмов, расположенных в районе гена *zinc ribbon domain-containing 1* (*ZNRD1*) (rs1048412, rs16896970, rs9261174, rs3869068, rs2074480, rs7758512, rs9261129, rs2301753 и rs2074479) и внутри гена *ring finger protein 39* (*RNF39*) связана с 5,8% вариативности равновесной вирусной нагрузки и скорости прогрессии ВИЧ-инфекции в СПИД. Эффект этих полиморфизмов на прогрессию заболевания и равновесную вирусную нагрузку проявляется независимо от полиморфизмов генов *HCP5* и *HLA-C*, а также от отдельных аллелей или групп аллелей *HLA*, связанных с контролем репликации ВИЧ-1.

Эффективность транскрипции провируса значительно варьирует у различных индивидуумов и определяет 64–83% от общей вариативности вирусной нагрузки [59]. Ген *ZNRD1* кодирует субъединицу РНК-полимеразы I. Механизм опосредуемого им ограничения ВИЧ-инфекции может быть связан с влиянием на процессинг транскриптов ВИЧ-1 с участием регуляторного белка Rev. Блокирование РНК-полимеразы I оказывает влияние на перенос Rev из ядрышка в цитоплазму. Экспрессия гена *ZNRD1* ассоциирована с полиморфизмами rs3869068 и rs9261174, которые расположены в регуляторном 5'-регионе. Полиморфизмы rs1048412, rs16896970, rs9261174 гена *ZNRD1* ассоциированы с замедлением развития СПИДа [48, 59], причем полиморфизм rs1048412 имеет достоверную ассоциацию с LT-NP-фенотипом [60].

Ассоциации полиморфизмов гена *RNF39* с устойчивостью или восприимчивостью к ВИЧ-инфекции недостаточно изучены, хотя выявлено большое их количество. Два полиморфизма rs2301753 и rs2074479 локализованы в кодирующем районе и приводят к заменам аминокислот [59].

Для рассмотренных аллелей характерен кумулятивный эффект, проявляющийся в повышенной устойчивости и (или) замедленном течении заболевания. Использование генетических данных позволит улучшить индивидуальное прогнозирование развития ВИЧ-инфекции и повысить эффективность терапии. Данные о распространенности выявленных полиморфизмов в той или иной расовой или популяционной группе могут быть применены

при разработке биомедицинских стратегий борьбы с ВИЧ-инфекцией (СПИДом) на национальном и международном уровнях [3, 28, 48].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Fellay J., Ge D., Shianna K., Colombo S., Ledergerber B., Cirulli E., Urban T., Zhang K., Gumbs C., Smith J., Castagna A., Cozzi-Lepri A., De Luca A., Easterbrook P., Günthard H., Mallal S., Mussini C., Dalmay J., Martinez-Picado J., Miro J., Obel N., Wolinsky S., Martinson J., Detels R., Margolick J., Jacobson L., Descombes P., Antonarakis S., Beckmann J., O'Brien S., Letvin N., McMichael A., Haynes B., Carrington M., Feng S., Telenti A., Goldstein D. Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans. *PLoS Genet.* 2009; 5 (12): e1000791. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000791.
2. König R., Zhou Y., Elleder D., Diamond T., Bonamy G., Irelan J., Chiang C., Tu B., De Jesus P., Lilley C., Seidel S., Opaluch A., Caldwell J., Weitzman M., Kuhen K., Bandyopadhyay S., Ideker T., Orth A., Miraglia L., Bushman F., Young J., Chanda S. Global analysis of hostpathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell.* 2008; 135 (1): 49–60. DOI: 10.1016/j.cell.2008.07.032.
3. McLaren P., Carrington M. The impact of host genetic variation on infection with HIV-1. *Nat. Immunol.* 2015; 16 (6): 577–583. DOI: 10.1038/ni.3147.
4. Хаитов Р.М. СПИД. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018: 496. [Khaitov R.M. AIDS. 2nd edition, revised and supplemented. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2018: 496 (in Russ.).]
5. Bashirova A., Bleiber G., Qi Y., Hutcheson H., Yamashita T., Johnson R., Cheng J., Alter G., Goedert J., Buchbinder S., Hoots K., Vlahov D., May M., Maldarelli F., Jacobson L., O'Brien S., Telenti A., Carrington M. Consistent effects of TSG101 genetic variability on multiple outcomes of exposure to human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2006; 80 (14): 6757–6763. DOI: 10.1128/JVI.00094-06.
6. Liu C., Perilla J., Ning J., Lu M., Hou G., Ramalho R., Himes B., Zhao G., Bedwell G., Byeon I., Ahn J., Gronenborn A., Prevelige P., Rouso I., Aiken C., Polenova T., Schulten K., Zhang P. Cyclophilin A stabilizes the HIV-1 capsid through a novel non-canonical binding site. *Nat. Commun.* 2016; 7: 10714. DOI: 10.1038/ncomms10714.
7. Rits M., van Dort K., Kootstra N. Polymorphisms in the regulatory region of the Cyclophilin A gene influence the susceptibility for HIV-1 infection. *PLoS One.* 2008; 3 (12): e3975. DOI: 10.1371/journal.pone.0003975.
8. Madlala P., Singh R., An P., Werner L., Mlisana K., Abdool Karim S., Winkler C., Ndung'u T. Association of polymorphisms in the regulatory region of the cyclophilin A gene (PPIA) with gene expression and HIV/AIDS disease progression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2016; 72 (5): 465–473. DOI: 10.1097/QAI.0000000000001028.
9. Fribourgh J., Nguyen H., Wolfe L., Dewitt D., Zhang W., Yu X., Rhoades E., Xiong Y. Core binding factor beta plays a critical role by facilitating the assembly of the

- Vif-cullin 5 E3 ubiquitin ligase. *J. Virol.* 2014; 88 (6): 3309–3319. DOI: 10.1128/JVI.03824-13.
10. Evans S., Schön A., Gao Q., Han X., Zhou X., Freire E., Yu X. HIV-1 Vif N-terminal motif is required for recruitment of Cul5 to suppress APOBEC3. *Retrovirology.* 2014; 11: 4–14. DOI: 10.1186/1742-4690-11-4.
 11. An P., Duggal P., Wang L., O'Brien S., Donfield S., Goedert J., Phair J., Buchbinder S., Kirk G., Winkler C. Polymorphisms of CUL5 are associated with CD4+ T cell loss in HIV-1 infected individuals. *PLoS Genet.* 2007; 3 (1): e19. DOI: 10.1371/journal.pgen.0030019.
 12. Towers G. The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology.* 2007; 4: 40. DOI: 10.1186/1742-4690-4-40.
 13. Yamashita M., Emerman M. Cellular restriction targeting viral capsids perturbs human immunodeficiency virus type 1 infection of nondividing cells. *J. Virol.* 2009; 83 (19): 9835–9843. DOI: 10.1128/JVI.01084-09.
 14. van Manen D., Rits M., Beugeling C., van Dort K., Schuitemaker H., Kootstra N. The effect of Trim5 polymorphisms on the clinical course of HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* 2008; 4 (2): e18. DOI: 10.1371/journal.ppat.0040018.
 15. Jaguva Vasudevan A., Smits S., Höppner A., Häussinger D., Koenig B., Münk C. Structural features of antiviral DNA cytidine deaminases. *Biol Chem.* 2013; 394 (11): 1357–1370. DOI: 10.1515/hsz-2013-0165.
 16. Valcke H., Bernard N., Bruneau J., Alary M., Tsoukas C., Roger M. APOBEC3G genetic variants and their association with risk of HIV infection in highly exposed Caucasians. *AIDS.* 2006; 20 (15): 1984–1986. DOI: 10.1097/01.aids.0000247124.35129.e1.
 17. An P., Johnson R., Phair J., Kirk G., Yu X., Donfield S., Buchbinder S., Goedert J., Winkler C. APOBEC3B Deletion and Risk of HIV-1 Acquisition. *J. Infect. Dis.* 2009; 200 (7): 1054–1058. DOI: 10.1086/605644.
 18. Naruse T., Sakurai D., Ohtani H., Sharma G., Sharma S., Vajpayee M., Mehra N., Kaur G., Kimura A. APOBEC3H polymorphisms and susceptibility to HIV-1 infection in an Indian population. *J. Hum. Genet.* 2016; 61 (3): 263–265. DOI: 10.1038/jhg.2015.136.
 19. An P., Penugonda S., Thorball C., Barthä I., Goedert J., Donfield S., Buchbinder S., Binns-Roemer E., Kirk G., Zhang W., Fellay J., Yu X., Winkler C. Role of APOBEC3F gene variation in HIV-1 disease Progression and *Pneumocystis pneumonia*. *PLoS Genet.* 2016; 12 (3): e1005921. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005921.
 20. Altfeld M., Kalife E.T., Qi Y., Streeck H., Lichterfeld M., Johnston M., Burgett N., Swartz M., Yang A., Alter G., Yu X., Meier A., Rockstroh J., Allen T., Jessen H., Rosenberg E., Carrington M., Walker B. HLA alleles associated with delayed progression to AIDS contribute strongly to the initial CD8(+) T cell response against HIV-1. *PLoS Med.* 2006; 3 (10): e403. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030403.
 21. Masemola A., Mashishi T., Khoury G., Mohube P., Mokgotho P., Vardas E., Colvin M., Zijenah L., Katzenstein D., Musonda R., Allen S., Kumwenda N., Taha T., Gray G., McIntyre J., Karim S.A., Sheppard H.W., Gray C.M. HIVNET 028 Study Team. Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8+ T cells: correlation with viral load. *J. Virol.* 2004; 78 (7): 3233–3243. DOI: 10.1128/JVI.78.7.3233-3243.2004.
 22. Kiepiela P., Leslie A.J., Honeyborne I., Ramduth D., Thobakgale C., Chetty S., Rathnavalu P., Moore C., Pfafferoth K.J., Hilton L., Zimbwa P., Moore S., Allen T., Brander C., Addo M., Altfeld M., James I., Mallal S., Bunce M., Barber L.D., Szinger J., Day C., Klennerman P., Mullins J., Korber B., Coovadia H.M., Walker B.D., Goulder P.J. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature.* 2004; 432 (7018): 769–775. DOI: 10.1038/nature03113.
 23. Gao X., Bashirova A., Iversen A., Phair J., Goedert J.J., Buchbinder S., Hoots K., Vlahov D., Altfeld M., O'Brien S., Carrington M. AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* 2005; 11 (12): 1290–1292. DOI: 10.1038/nm1333.
 24. Gillespie G., Kaul R., Dong T., Yang H., Rostron T., Bwayo J., Kiama P., Peto T., Plummer F., McMichael A., Rowland-Jones S. Cross-reactive cytotoxic T lymphocytes against a HIV-1 p24 epitope in slow progressors with B*57. *AIDS.* 2002; 16 (7): 961–972. DOI: 10.1097/00002030-200205030-00002.
 25. Miura T., Brockman M.A., Schneidewind A., Lobritz M., Pereyra F., Rathod A., Block B.L., Brumme Z.L., Brumme C.J., Baker B., Rothchild A.C., Li B., Trocha A., Cutrell E., Frahm N., Brander C., Toth I., Arts E.J., Allen T.M., Walker B.D. HLA-B57/B*5801 human immunodeficiency virus type 1 elite controllers select for rare gag variants associated with reduced viral replication capacity and strong cytotoxic T-lymphocyte recognition. *J. Virol.* 2009; 83 (6): 2743–2755. DOI: 10.1128/JVI.02265-08.
 26. Kaur G., Mehra N. Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: immune response genes. *Tissue Antigens.* 2009; 74 (5): 373–385. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2009.01337.x.
 27. Bailey J., Williams T., Siliciano R., Blankson J. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J. Exp. Med.* 2006; 203 (5): 1357–1369. DOI: 10.1084/jem.20052319.
 28. Van Manen D., van Wout A., Schuitemaker H. Genome-wide association studies on HIV susceptibility, pathogenesis and pharmacogenomics. *Retrovirology.* 2012; 9: 70. DOI: 10.1186/1742-4690-9-70.
 29. Hewitt R. Abacavir Hypersensitivity Reaction. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34 (8): 1137–1142. DOI: 10.1086/339751.
 30. Colombo S., Rauch A., Rotger M., Fellay J., Martinez R., Fux C., Thurnheer C., Günthard H.F., Goldstein D.B., Furrer H., Telenti A. Swiss HIV Cohort Study. The HCP5 single-nucleotide polymorphism: a simple screening tool for prediction of hypersensitivity reaction to abacavir. *J. Infect. Dis.* 2008; 198 (6): 864–867. DOI: 10.1086/591184.

31. Chessman D., Kostenko L., Lethborg T., Purcell A.W., Williamson N., Chen Z., Kjer-Nielsen L., Mifsud N., Tait B., Holdsworth R., Almeida C., Nolan D., Macdonald W., Archbold J., Kellerher A., Marriott D., Mallal S., Bhadraraj M., Rossjohn J., McCluskey J. Human leukocyte antigen class I-restricted activation of CD8+ T cells provides the immunogenetic basis of a systemic drug hypersensitivity. *Immunity*. 2008; 28 (6): 822–832. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.04.020.
32. Mallal S., Nolan D., Witt C., Masel G., Martin A., Moore C., Sayer D., Castley A., Mamotte C., Maxwell D., James I., Christiansen F. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet*. 2002; 359 (9308): 727–732. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)07873-X.
33. Martin A., Nolan D., Gaudieri S., Almeida C.A., Nolan R., James I., Carvalho F., Phillips E., Christiansen F., Purcell A., McCluskey J., Mallal S. Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B*5701 and a haplotypic Hsp70-Hom variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101 (12): 4180–4185. DOI: 10.1073/pnas.0307067101.
34. Rauch A., Nolan D., Thurnheer C., Fux C., Cavassini M., Chave J., Opravil M., Phillips E., Mallal S., Furrer H.; Swiss HIV Cohort Study. Refining abacavir hypersensitivity diagnoses using a structured clinical assessment and genetic testing in the Swiss HIV Cohort Study. *Antivir. Ther.* 2008; 13 (8): 1019–1028. DOI: 10.1086/504874.
35. Mahungu T., Johnson M., Owen A., Back D. The impact of pharmacogenetics on HIV therapy. *Int. J. STD AIDS*. 2009; 20 (3): 145–151. DOI: 10.1258/ijsa.2008.008369.
36. Schneidewind A., Brockman M., Yang R., Adam R., Li B., Le Gall S., Rinaldo C., Craggs S., Allgaier R., Power K., Kuntzen T., Tung C., LaBute M., Mueller S., Harrer T., McMichael A., Goulder P., Aiken C., Brander C., Kellerher A., Allen T. Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* 2007; 81 (22): 12382–12393. DOI: 10.1128/JVI.01543-07.
37. Cornelissen M., Hoogland F., Back N., Jurriaans S., Zorgdrager F., Bakker M., Brinkman K., Prins M., van der Kuyl A. Multiple transmissions of a stable human leukocyte antigen-B27 cytotoxic T-cell-escape strain of HIV-1 in The Netherlands. *AIDS*. 2009; 23 (12): 1495–1500. DOI: 10.1097/QAD.0b013e32832d9267.
38. Stephens H. HIV-1 diversity versus HLA class I polymorphism. *Trends Immunol.* 2005; 26 (1): 41–47. DOI: 10.1016/j.it.2004.11.001.
39. Lajoie J., Hargrove J., Zijenah L., Humphrey J., Ward B., Roger M. Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1. *J. Infect. Dis.* 2006; 193 (2): 298–301. DOI: 10.1086/498877.
40. McDonald K., Fowke K., Kimani J., Dunand V., Nagelkerke N., Ball T., Oyugi J., Njagi E., Gaur L., Brunham R., Wade J., Luscher M., Krausa P., Rowland-Jones S., Ngugi E., Bwayo J., Plummer F. Influence of HLA supertypes on susceptibility and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect. Dis.* 2000; 181 (5): 1581–1589. DOI: 10.1086/315472.
41. Liu C., Carrington M., Kaslow R., Gao X., Rinaldo C., Jacobson L., Margolick J., Phair J., O'Brien S., Detels R. Association of polymorphisms in human leukocyte antigen class I and transporter associated with antigen processing genes with resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect. Dis.* 2003; 187 (9): 1404–1410. DOI: 10.1086/374394.
42. Flores-Villanueva P., Hendel H., Caillat-Zucman S., Rappaport J., Burgos-Tiburcio A., Bertin-Maghit S., Ruiz-Morales J., Teran M., Rodriguez-Tafur J., Zagury J. Associations of MHC ancestral haplotypes with resistance/susceptibility to AIDS disease development. *J. Immunol.* 2003; 170 (4): 1925–1929. DOI: 10.4049/jimmunol.170.4.1925.
43. Singh P., Kaur G., Sharma G., Mehra N. Immunogenetic basis of HIV-1 infection, transmission and disease progression. *Vaccine*. 2008; 26 (24): 2966–2980. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.01.012.
44. Adnan S., Balamurugan A., Trocha A., Bennett M., Ng H., Ali A., Brander C., Yang O. Nef interference with HIV-1-specific CTL antiviral activity is epitope specific. *Blood*. 2006; 108 (10): 3414–3419. DOI: 10.1182/blood-2006-06-030668.
45. Trachtenberg E., Korber B., Sollars C., Kepler T., Hraber P., Hayes E., Funkhouser R., Fugate M., Theiler J., Hsu Y., Kunstman K., Wu S., Phair J., Erlich H., Wolinsky S. Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nat. Med.* 2003; 9 (7): 928–935. DOI: 10.1038/nm893.
46. HIV molecular immunology database. 2016. <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/>.
47. Lacap P., Huntington J., Luo M., Nagelkerke N., Bielawny T., Kimani J., Wachihi C., Ngugi E., Plummer F. Associations of human leukocyte antigen DRB with resistance or susceptibility to HIV-1 infection in the Pumwani Sex Worker Cohort. *AIDS*. 2008; 22 (9): 1029–1038. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3282ff83db.
48. An P., Winkler C. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet.* 2010; 26 (3): 119–131. DOI: 10.1016/j.tig.2010.01.002.
49. Malhotra U., Holte S., Dutta S., Berrey M., Delpit E., Koelle D., Sette A., Corey L., McElrath M. Role for HLA class II molecules in HIV-1 suppression and cellular immunity following antiretroviral treatment. *J. Clin. Invest.* 2001; 107 (4): 505–517. DOI: 10.1172/JCI11275.
50. Hardie R., Luo M., Bruneau B., Knight E., Nagelkerke N., Kimani J., Wachihi C., Ngugi E., Plummer F. Human leukocyte antigen-DQ alleles and haplotypes and their associations with resistance and susceptibility to HIV-1

- infection. *AIDS*. 2008; 22 (7): 807–816. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3282f51b71.
51. Carrington M., Martin M., van Bergen J. KIR-HLA inter-course in HIV disease. *Trends Microbiol.* 2008; 16 (12): 620–627. DOI: 10.1016/j.tim.2008.09.002
 52. Boyton R., Altmann D. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2007; 149 (1): 1–8. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2007.03424.x.
 53. Jennes W., Verheyden S., Demanet C., Adjé-Touré C., Vuylsteke B., Nkengasong J., Kestens L. Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J. Immunol.* 2006; 177 (10): 6588–6592. DOI: 10.4049/jimmunol.177.10.6588.
 54. Qi Y., Martin M., Gao X., Jacobson L., Goedert J., Buchbinder S., Kirk G., O'Brien S., Trowsdale J., Carrington M. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog.* 2006; 2 (8): e79. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020079.
 55. Long B., Ndhlovu L., Oksenberg J., Lanier L., Hecht F., Nixon D., Barbour J. Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 2008; 82 (10): 4785–4792. DOI: 10.1128/JVI.02449-07.
 56. Alter G., Martin M., Teigen N., Carr W., Suscovich T., Schneidewind A., Streeck H., Waring M., Meier A., Brander C., Lifson J., Allen T., Carrington M., Altfeld M. Differential natural killer cell mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J. Exp. Med.* 2007; 204 (12): 3027–3036. DOI: 10.1084/jem.20070695.
 57. Boulet S., Kleyman M., Kim J., Kamya P., Sharafi S., Simic N., Bruneau J., Routy J., Tsoukas C., Bernard N. A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. *AIDS*. 2008; 22 (12): 1487–1491. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3282ffde7e.
 58. Habegger de Sorrentino A., Sinchi J.L., Marinic K., Lypez R., Illiovič E. Kir-HLA-A and B alleles of the Bw4 epitope against HIV infection in discordant heterosexual couples in Chaco Argentina. *Immunology*. 2013; 140 (2): 273–279. DOI: 10.1111/imm.12137.
 59. Lin Y., Lan Y., Hung C., Lin T., Huang S., Liao C., Lin C., Lai C., Tien N., Liu X., Ho M., Chien W., Chen J., Wang J., Tsai F. Variants in ZNRD1 gene predict HIV-1/AIDS disease progression in a Han Chinese population in Taiwan. *PLoS One*. 2013; 8 (7): e67572. DOI: 10.1371/journal.pone.0067572.
 60. Ballana E., Senserrich J., Pauls E., Faner R., Mercader J. ZNRD1 (zinc ribbon domain-containing 1) is a host cellular factor that influences HIV-1 replication and disease progression. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 50 (7): 1022–1032. DOI: 10.1086/651114.

Сведения об авторах

Хаитов Рахим Мусаевич, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель Института иммунологии, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-3064-8871.

Алексеев Леонид Петрович, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, зав. отделом, Институт иммунологии, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-0432-9439.

Гудима Георгий Олегович, д-р биол. наук, зав. лабораторией, Институт иммунологии, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-2864-6949.

Кофиади Илья Андреевич, д-р биол. наук, зав. лабораторией, Институт иммунологии, г. Москва. ORCID iD 0000-0001-9280-8282.

(✉) Гудима Георгий Олегович, e-mail: goudima@mail.ru.

Поступила в редакцию 21.09.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Author information

Khaitov Rahim M., DM, Professor, Academician of the RAS, Scientific Director of the Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3064-8871.

Alekseev Leonid P., DM, Professor, Corresponding Member of the RAS, Head of the Department, Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0432-9439.

Gudima Georgy O., DBSc, Head of the Laboratory, Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2864-6949.

Kofiadi Ilya A., DBSc, Head of the Laboratory, Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-9280-8282.

(✉) Gudima Georgy O., e-mail: goudima@mail.ru.

Received 21.09.2018

Accepted 17.12.2018

УДК 578.28HIV:578.23
[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-131-141](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-131-141)

Генетические факторы, влияющие на проникновение ВИЧ в клетку-мишень

Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Кофиади И.А., Гудима Г.О.

*Институт иммунологии
Россия, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24*

РЕЗЮМЕ

Восприимчивость к ВИЧ-инфекции, а также динамика развития заболевания носят индивидуальный характер. Раскрытие генетических основ естественной резистентности к ВИЧ чрезвычайно важно для выработки эффективных стратегий контроля заболевания. Обзор посвящен анализу аллельных вариантов генов хозяина, которые кодируют рецепторы и их лиганды, участвующие в процессе проникновения вируса в клетку-мишень. Эти аллельные варианты и их сочетания способны оказывать значимое влияние на устойчивость либо чувствительность индивидуума к ВИЧ-инфекции, а также могут быть ассоциированы со скоростью прогрессии ВИЧ-инфекции в СПИД.

Ключевые слова: ВИЧ, гены, аллели, патогенез, рецепторы, устойчивость/чувствительность к ВИЧ-инфекции.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при написании статьи.

Для цитирования: Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Кофиади И.А., Гудима Г.О. Генетические факторы, влияющие на проникновение ВИЧ в клетку-мишень. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 131–141. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-131-141](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-131-141).

УДК 578.28HIV:578.23
[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-131-141](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-131-141)

Genetic factors influencing HIV entry into target cells

Khaitov R.M., Alexeev L.P., Kofiadi I.A., Gudima G.O.

*Institute of Immunology
24, Kashirskoye Sh., Moscow, 115478, Russian Federation*

ABSTRACT

Susceptibility to HIV and the dynamics of HIV infection progression to AIDS are dependent on unique individual factors. Revealing genetic features of natural resistance to HIV infection is of great importance

✉ Гудима Георгий Олегович, e-mail: goudima@mail.ru.

for the development of effective strategies for disease control. This review presents an analysis of host gene alleles coding receptors and their ligands participating in viral entrance to target cell. These allelic variants and their combinations can have a significant influence on the individual resistance/sensitivity to HIV infection and may be associated with the HIV infection progression to AIDS.

Key words: HIV, genes, alleles, pathogenesis, receptors, resistance/susceptibility to HIV infection.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

For citation: Khaitov R.M., Alexeev L.P., Kofiadi I.A., Gudima G.O. Genetic factors influencing HIV entry into target cells. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 131–141. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-131-141](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-131-141).

ВВЕДЕНИЕ

Поиск и идентификация вариантов генов, ассоциированных с особенностями (устойчивость или чувствительность, предрасположенность, характер течения) заболевания, имеют важное значение для совершенствования эпидемиологического прогнозирования, улучшения диагностики, развития персонализированного подхода к лечению пациентов. Особую значимость такие исследования приобретают в контексте борьбы с социально значимыми инфекционными заболеваниями, к числу которых относятся ВИЧ-инфекция (СПИД), гепатиты В и С, туберкулез, малярия и ряд других. Учет индивидуальных генетических маркеров предрасположенности и устойчивости человека к инфекционным заболеваниям позволяет улучшить определение риска заболевания, усовершенствовать стратегии профилактики, повысить эффективность вакцинации и противовирусной терапии. В настоящем обзоре рассматриваются варианты генов, ассоциированные с индивидуальной устойчивостью/чувствительностью к ВИЧ-инфекции.

Когортные и популяционные исследования показали индивидуальный характер чувствительности к ВИЧ-инфекции, а также гетерогенность развития заболевания у отдельных индивидуумов. Обнаружены индивидуумы, которые остаются неинфицированными, несмотря на повторяющиеся контакты с вирусом (постоянно серонегативные лица с высоким риском ВИЧ-инфекции, highly exposed permanently seronegative, HEPS), т. е. обладают определенной устойчивостью к инфекции. Среди ВИЧ-инфицированных лиц выявлены «долговременные непрогрессоры» (long term non-progressors, LTNP) – индивидуумы, у которых без применения антиретровирусной терапии

вирусная нагрузка в течение длительного времени сохраняется на относительно низком уровне и наблюдается замедленное развитие заболевания. В обеих группах описаны сходные характеристики иммунного ответа, в том числе образование нейтрализующих антител и эффекторных клеток, направленных против сходных антигенов, что может препятствовать проникновению и распространению вируса.

Понимание механизмов естественной устойчивости к ВИЧ-инфекции имеет важное значение для разработки новых антивирусных стратегий, в том числе создания инновационных вакцинных конструкций и методов генотерапии [1, 2]. Установлению генов хозяина, влияющих на различные этапы жизненного цикла ВИЧ, изучению их полиморфизма и оценке роли аллельных вариантов в развитии заболевания посвящены многочисленные исследования [3–12]. При объяснении повышенной или пониженной восприимчивости к ВИЧ-инфекции рассматриваются генетические особенности, характеристики врожденного и адаптивного иммунитета, мутации или аттенуация вируса.

Устойчивость или чувствительность к ВИЧ-инфекции и динамика развития СПИДа в значительной степени определяются аллельным состоянием ряда генов хозяина, которые можно отнести к одной из двух категорий:

1. Гены хозяина, которые вовлечены в жизненный цикл ВИЧ от момента входа вируса в клетки-мишени до внутриклеточных процессов, обеспечивающих репликацию вируса и выход из клетки новых вирусных частиц.

2. Гены хозяина, связанные с функционированием его иммунной системы и специфическими защитными антиретровирусными механизмами.

Использование технологий широкогеномных исследований Genome-Wide Association Studies позволило получить наиболее полное представление о влиянии изменчивости генома человека на индивидуальные особенности протекания ВИЧ-инфекции [7, 12]. В обзоре будут рассмотрены гены человека, участвующие в процессе проникновения вируса в клетку-мишень.

ГЕНЫ РЕЦЕПТОРОВ ХЕМОКИНОВ

Для входа ВИЧ в клетки-мишени требуется наличие функционально активных поверхностных рецепторов CD4 и корецепторов. Для М-тропных штаммов вируса основным корецептором служит хемокиновый рецептор CCR5, для Т-тропных штаммов вируса – CXCR4. В качестве минорных корецепторов ВИЧ-1 могут выступать CCR2, CX3CR1 и другие хемокиновые рецепторы, а также рецепторы DC-SIGN (CD209) на дендритных клетках и SDC2 на клетках эндотелия. Полиморфизм любого из этих рецепторов может привести либо к повышенной восприимчивости, либо наоборот – устойчивости к ВИЧ-инфекции. Кроме того, связывание лигандов с соответствующими корецепторами (CCL5, CCL3, CCL3L1 и CCL4 для CCR5 и CXCL12 для CXCR4) может в различной степени предотвращать вход ВИЧ в клетки. Полиморфизм этих лигандов влияет как на индивидуальную восприимчивость к ВИЧ-инфекции, так и на прогрессию заболевания [2, 11, 13–16].

Ген рецептора CXCR4

Значимых полиморфизмов рецептора CXCR4 не описано. Функциональный рецептор CXCR4 необходим для нормального индивидуального развития организма [17]. Появление штаммов ВИЧ-1, использующих CXCR4 для инфицирования клеток-мишеней, ассоциировано с ускорением прогрессии заболевания и усилением потери CD4⁺-Т-клеток [2, 16, 18].

Ген рецептора CCR5

Наличие или отсутствие полноразмерного и нормально функционирующего рецептора CCR5 не влияет на осуществление важных процессов жизнедеятельности человека, в том числе и на функционирование иммунной системы [19]. Таким образом, ингибиторы функциональной активности рецептора CCR5 могут быть использованы для подавления ВИЧ-инфекции *in vivo* без существенных побочных эффектов для человека.

Ген CCR5 расположен на коротком плече хромосомы 3 в составе кластера генов, кодирующих и другие хемокиновые рецепторы (CCR1, CCR2, CCR3, CCRL2, CCRX, CCXCR1). Обнару-

жено более 10 мутаций в промоторной области гена CCR5 и более 20 мутаций – в его кодирующей части. Для ряда этих мутаций была показана ассоциация с устойчивостью к ВИЧ-инфекции и скоростью прогрессии заболевания [16, 20, 21].

Делеция 32 пар нуклеотидов в кодирующей области гена CCR5, которая соответствует второй внеклеточной петле трансмембранного белка, приводит к сдвигу рамки считывания и преждевременному окончанию трансляции. В результате белок CCR5 лишается трех трансмембранных сегментов и теряет функциональность. Этот мутантный аллель обозначается как Δ32 (rs333). Нормальный белок CCR5 имеет молекулярную массу 46 кДа и содержит 352 аминокислотных остатка, в то время как мутантный вариант белка имеет молекулярную массу 30 кДа и содержит 215 аминокислотных остатков [22].

Аллель CCR5Δ32 встречается у 4–15% этнических европейцев, его наибольшая частота отмечается в Северной Европе [20, 23]. Гомозиготный генотип D32/D32 распространен среди HEPS и не выявлен среди нескольких тысяч обследованных ВИЧ-инфицированных пациентов. Частота встречаемости мутации CCR5Δ32 в группе LTNP существенно не отличается от частоты ее встречаемости в основной популяции [14]. У жителей Африки, расположенной южнее Сахары, этот мутантный аллель отсутствует, хотя именно там отмечено наибольшее число случаев ВИЧ-инфекции и выявлены многочисленные группы HEPS [24].

Мононуклеарные клетки периферической крови, выделенные от HEPS с гомозиготной мутацией CCR5Δ32/D32, были абсолютно устойчивы к инфицированию вирусами фенотипа R5 и восприимчивы к инфицированию штаммами вируса фенотипа X4. Аллель CCR5Δ32 препятствует инфицированию гомозиготных индивидуумов R5-штаммами ВИЧ-1 при половом контакте, обуславливает частичную устойчивость к инфицированию ВИЧ-1 фенотипа R5X4 и существенно замедляет прогрессию ВИЧ-инфекции у гетерозиготных носителей [25].

Гомозиготность по CCR5Δ32 не гарантирует абсолютной защиты от ВИЧ-инфекции [2, 4, 20, 26–28]. У ВИЧ-инфицированных индивидуумов, гетерозиготных по CCR5Δ32, наблюдается замедленная прогрессия заболевания. Фенотипический эффект гетерозиготности по CCR5Δ32 проявляется в снижении экспрессии функциональных молекул этого корецептора на поверхности клетки по сравнению с гомозиготным «диким» типом. Как следствие, для ВИЧ-1 в организме хозяина с гетерозиготным генотипом уменьшается возможность

связаться со своим корецептором, что замедляет распространение вируса в организме [2, 4, 19, 29].

Обнаружены индивидуумы, гетерозиготные по мутации CCR5 Δ 32, клетки которых имели абсолютную устойчивость к R5-вирусам *in vitro*. Впоследствии было показано, что причиной этого служит достаточно редкая мутация CCR5 303TaA (M303, C101X, rs1800560). В положении 303 нуклеотидной последовательности гена CCR5 происходит замена TaA, приводящая к преждевременному образованию стоп-кодона. В результате нарушается функциональность образующегося мутантного корецептора и блокируется вход R5-штаммов ВИЧ в клетку-мишень [30, 31].

Сочетание в генотипе аллелей CCR5 Δ 32 и CCR5m303A приводит к наибольшей устойчивости к ВИЧ-инфекции [15]. Обе эти мутации были обнаружены исключительно у индивидуумов европейского происхождения. Средняя частота протективных мутантных аллелей CCR5 Δ 32 и CCR5m303A составила 10 и 0,2% соответственно [32].

С ускоренной прогрессией ВИЧ-инфекции в СПИД ассоциирован аллель CCR5P1 (rs113552054) [11, 19]. Ассоциация с ускоренным развитием ВИЧ-инфекции и ее прогрессией в СПИД показана для мутации 59029AaG (rs1799987) в первом интроне гена CCR5. У пациентов с генотипом 59029A/A, не имеющих аллелей CCR5 Δ 32 или CCR2-64I, отмечена ускоренная прогрессия ВИЧ-инфекции в СПИД по сравнению с носителями генотипов 59029G/G или 59029A/G [20].

Ген рецептора CCR2

Хемокиновый рецептор CCR2 – минорный корецептор для М-тропных штаммов ВИЧ-1. Ген CCR2, расположенный на хромосоме 3 в области 3p21, кодирует две изоформы рецептора (CCR2A и CCR2B). Хорошо изучена мутация CCR2-V64I (rs1799864), которая приводит к замене AaG в 190-й позиции последовательности гена CCR2, в результате которой аминокислота валин заменяется на изолейцин в 64-й позиции последовательности белка. Мутантный аллель CCR2-64I ассоциирован с замедлением прогрессии ВИЧ-инфекции в СПИД по доминантному типу. Аллель CCR2-64I наиболее распространен в популяциях континентальной Азии и Африки, где его частота превышает 35%. В странах Европы частота этого аллеля несколько ниже, наиболее редко он встречается в странах Океании [2, 24].

Защитный эффект варианта CCR2-64I проявляется как у гомозигот, так и у гетерозигот. Молекулярный механизм, лежащий в основе защитного эффекта данной мутации, не ясен. Мутация

расположена в трансмембранном домене и не может влиять на эффективность проникновения ВИЧ в клетку, она не вызывает изменения количества рецепторов CCR2 и не влияет на передачу сигнала от CCR2-специфичных лигандов. Предполагается, что протективный эффект CCR2-64I имеет опосредованный характер. В частности, высказывалась гипотеза, что мутация CCR2-V64I снижает экспрессию корецептора CCR5, однако достоверной ассоциации между полиморфизмом CCR2-V64I и уровнем экспрессии CCR5 обнаружить не удалось [2, 26].

Ген рецептора DC-SIGN (CD209)

Этот рецептор экспрессируется на макрофагах и дендритных клетках [33]. Связывание ВИЧ-1 с дендритными клетками осуществляется в результате взаимодействия gp120 с молекулами DC-SIGN. Дендритные клетки переносят комплекс DC-SIGN/ВИЧ-1 в лимфоузлы к CD4⁺-Т-лимфоцитам и способствуют их инфицированию за счет взаимодействия между DS-SIGN и ICAM-3 [20, 34, 35].

Ген CD209 (CLEC4M), кодирующий рецептор DC-SIGN, расположен на хромосоме 19 в области 19p13.2-3. Обнаружена ассоциация однонуклеотидного полиморфизма 366C→T (rs2277998) в промоторной области этого гена с восприимчивостью к ВИЧ-инфекции при вертикальном пути передачи. Для исследованной группы аллель –366T оказался протективным. Достоверных различий в частотах аллелей –366T и –366C в группах здоровых и ВИЧ-инфицированных лиц не выявлено [20]. Некоторые другие маннозные рецепторы на поверхности дендритных клеток способны ингибировать инфицирование Т-клеток штаммами R5, X4 и R5X4 [36].

Ген рецептора DARC (CD234)

Белок DARC (Даффи-антиген) является рецептором ряда цитокинов – ИЛ-8, MCP-1, RANTES, PF4 (CXCL4), ENA-78 (CXCL5), NAP-2 (CXCL7), NAP-3 (CXCL1/CXCL2) [37, 38]. DARC выявлен на эритроцитах, ретикулоцитах, эпителиальных клетках, на эндотелиальных клетках посткапиллярных венул селезенки, почки, печени, эндотелиальных клетках сосудов легких, на некоторых типах нейронов в ЦНС [39]. DARC необходим для проникновения малярийного плазмодия в эритроциты. Большинство африканцев, у которых отсутствует Даффи-антиген, резистентны к малярии [37].

DARC способен формировать гетеродимеры с рецептором CCR5. При этом нарушается процесс передачи сигнала через CCR5 [40]. DARC регули-

рует уровень циркулирующих цитокинов, а также участвует в транцитозе хемокинов и регуляции миграции лейкоцитов [41–43]. Ген *DARC* локализован на длинном плече хромосомы 1 (1q23.2). Мутация 46T→C в промоторной области гена связана с уровнем экспрессии рецептора *DARC*. Мутации rs12075 (Asp42Gly), rs2427837, rs3027012, rs3027016, rs863002 связаны с *DARC*-опосредованной регуляцией уровня циркулирующих хемокинов [42]. Наличие «нулевого» аллеля 46C в гомозиготной форме приводит к полному подавлению экспрессии *DARC* в эритроцитах и, как следствие, к резистентности к малярийному плазмодию. Гомозиготы 46C/C чаще всего встречаются в регионах наибольшего распространения этого патогена. Аллельный вариант 46C закреплен в популяциях, проживающих в Африке южнее Сахары, аллель 46T закреплен в европейских популяциях.

Обнаружена связь экспрессии *DARC* и восприимчивости к ВИЧ-инфекции [29]. Частота гомозигот 46C/C среди ВИЧ-инфицированных афроамериканцев составляет 70%, а среди ВИЧ-неинфицированных – 60%. Отсутствие рецептора *DARC* ассоциировано с увеличением восприимчивости к ВИЧ-инфекции. Наличие «нулевого» генотипа связано с замедленной прогрессией заболевания [29, 44, 45].

ГЕНЫ ХЕМОКИНОВ – ЛИГАНДОВ КОРЕЦЕПТОРОВ

Хемокины являются естественными лигандами корецепторов, которые ВИЧ использует для входа в клетки-мишени. Они оказывают влияние на вход ВИЧ в клетки-мишени за счет конкуренции с вирусом за связывание с корецептором и путем снижения экспрессии корецепторов на поверхности клеток в результате интернализации после взаимодействия с лигандом. В генах, кодирующих *RANTES*, воспалительные белки макрофагов *MIP1α* и *MIP1β*, фактор *SDF-1*, описаны полиморфизмы, ассоциированные с дифференциальной восприимчивостью к ВИЧ-инфекции.

Ген *CCL5 (SCYA5)*

Хемокин *RANTES (CCL5)* служит лигандом для хемокиновых рецепторов *CCR1*, *CCR3*, *CCR5* и является хемоаттрактантом для моноцитов и Т-клеток фенотипа $CD4^+/CD45RO^+$. *RANTES* способен существенно подавлять репликацию ВИЧ *in vitro* [46]. Снижение уровня его экспрессии *in vivo* ускоряет прогрессию ВИЧ-инфекции в СПИД. При повышенной экспрессии *RANTES* наблюдается обратный эффект [47].

RANTES кодируется геном *CCL5 (SCYA5)*, который расположен на хромосоме 17 (17q11.2). Полиморфизмы, расположенные в регуляторных областях гена *CCL5*, сгруппированы в гаплогруппы и модулируют экспрессию этого гена. Эти полиморфизмы могут быть связаны с индивидуальными различиями в восприимчивости к ВИЧ и прогрессии заболевания [13–15, 19].

Мутации *RANTES* –403G/A (rs 2107538) и –28C/G (rs117719740) в промоторном участке гена *CCL5 (SCYA5)* оказывали модулирующее воздействие на уровень транскрипции этого гена *in vitro*. Расширенный мета-анализ показал, что полиморфизмы –403G/A и –28C/G значимо ассоциированы с пониженной чувствительностью к ВИЧ-инфекции. Связь полиморфизмов –403G/A и –28C/G с замедлением прогрессии ВИЧ-инфекции не подтвердилась [46]. Полиморфизм In1.1T/C в первом интроне гена *CCL5* связан со снижением продукции *RANTES*. Этот полиморфизм ассоциирован с повышенным риском ВИЧ-инфекции, а у ВИЧ-инфицированных пациентов-носителей In1.1T/C наблюдается ускорение прогрессии заболевания [46, 48].

Ген *CXCL12 (SDF-1, CXCL12)*

SDF-1 (CXCL12) является лигандом рецептора *CXCR4* – одного из основных корецепторов, обеспечивающих слияние Т-тропных штаммов ВИЧ-1 с клетками-мишенями [49]. Связывание *SDF-1* с рецепторами приводит к интернализации последних и, как следствие, предотвращает связывание рецепторов с ВИЧ [20]. *SDF-1* кодируется геном *CXCL12*, который локализован на хромосоме 10 (10q11). *SDF-1* представлен в виде нескольких изоформ, образующихся в результате альтернативного сплайсинга: *SDF-1α* (89 аминокислотных остатков), *SDF-1β* (93 аминокислотных остатка), *SDF-1γ* (119 аминокислотных остатков), *SDF-1δ* (140 аминокислотных остатков), *SDF-1ε* (90 аминокислотных остатков) и *SDF-1φ* (100 аминокислотных остатков) [50]. Выявлены мембранная, внутриклеточная и растворимая формы этого хемокина. Клетками-мишенями *SDF-1 (CXCL12)* служат в основном лимфоциты и моноциты, он также является хемоаттрактантом для лейкоцитов [49]. *SDF-1* усиливает хемотаксис, ингибирует апоптоз, стимулирует пролиферацию.

Точечная замена G→A в 3'-нетранслируемой области *CXCL12* приводит к образованию варианта *CXCL12-3'A (SDF1-3'A)*. Эта мутация расположена в области двух блоков высококонсервативных нуклеотидных последовательностей. Мутация *SDF1-3'A* в гомозиготном состоянии

ассоциирована с существенным увеличением экспрессии хемокинов и, как следствие, с эффективным блокированием Т-тропных штаммов ВИЧ [19, 49, 51]. Данные о влиянии мутации SDF1-3'A на развитие ВИЧ-инфекции в СПИД противоречивы: наблюдалось как замедление прогрессии заболевания, так и ускоренное развитие СПИДа для гомозигот SDF1-3'A по сравнению с гетерозиготами или гомозиготами по аллелю дикого типа [20, 27]. Сочетание в индивидуальном генотипе аллеля SDF1-3'A в гомозиготной форме с протективными аллелями CCR5-Δ32 и CCR2-64I увеличивает суммарный защитный эффект против ВИЧ-инфекции. Это связано с тем, что мутантные формы рецепторов CCR5Δ32 и CCR2-64I противодействуют R5-штаммам вируса, в то время как SDF1-3'A противодействует X4-штаммам [19]. Наибольшая частота аллеля SDF1-3'A наблюдается в странах Океании (72%). Среди коренного населения Африки данный аллель практически не встречается. Частота встречаемости аллеля SDF1-3'A в других обследованных популяциях варьирует от 3 до 43% [24].

Ген CCL3 (MIP-1α, CCL3)

Белок MIP-1α (CCL3) кодируется геном CCL3, который расположен на хромосоме 17 (17q12). MIP-1α является лигандом рецепторов CCR1, CCR4 и CCR5, активирует и рекрутирует полиморфноядерные лейкоциты в острой фазе воспаления. Уровень MIP-1α в организме человека в значительной степени зависит от количества копий гена CCL3, кодирующего этот белок [52].

Ряд полиморфизмов, расположенных в кодирующих и некодирующих областях гена CCL3, ассоциирован как с устойчивостью к ВИЧ-инфекции, так и с прогрессией ВИЧ-инфекции в СПИД [48]. Полиморфизм по числу копий гена CCL3L1 (или MIP1αP) ассоциирован с устойчивостью к ВИЧ-инфекции и замедленным развитием заболевания. Наибольшее число копий этого гена обнаружено у представителей африканского населения [53]. Мутация 459CaT (rs2282674), расположенная в интроне гена CCL3L1, ассоциирована с увеличением скорости развития заболевания [20].

Ген CCL4 (MIP-2β, CCL4)

Белок MIP-2β кодируется геном CCL4, расположенным на хромосоме 17 (17q11.2). MIP-2β является лигандом рецептора CCR5 и имеет высокий уровень гомологии с MIP-1α (CCL3). Он служит хемоаттрактантом для НК-клеток, моноцитов и ряда других иммунцитов [54]. MIP-2β

представляет собой основной ВИЧ-супрессирующий фактор, продуцируемый CD8⁺-Т-клетками, в основном – CD8⁺-Т-клетками памяти [55].

Ген CCL4 представлен двумя аллельными формами: L1 и L2. У индивидуумов, гомозиготных по аллелю L2, уровень транскрипции этого гена снижен по сравнению с гомозиготами L1/L1. У ВИЧ-инфицированных пациентов частота аллеля L2 оказалась достоверно выше, чем в группе здоровых доноров [20]. Снижение экспрессии гена CCL4 приводит к снижению конкуренции с ВИЧ-1 за связывание с рецептором CCR5, который ВИЧ использует для слияния с клеткой-мишенью [2, 23, 27].

Ген CCL2 (MCP-1, CCL2)

Белок MCP-1 является лигандом рецептора CCR2. CCL2 участвует в ряде физиологических и патологических процессов, в том числе в патогенезе ВИЧ-инфекции (СПИДа) [56, 57].

Ген CCL2, кодирующий MCP-1, расположен на хромосоме 17 (17q11.2-q21.1). Анализ кластера генов CCL2-CCL7-CCL11 выявил полиморфизмы, приводящие к уменьшению восприимчивости к ВИЧ-инфекции [48, 58]. Наиболее вероятно, причиной уменьшения индивидуальной восприимчивости является увеличение уровня экспрессии хемокинов. В частности, показана ассоциация полиморфизма –2578G, расположенного в промоторной области гена CCL2, со снижением риска заражения ВИЧ-1. Наличие мутантного аллеля приводило к изменению связывания транскрипционного фактора IRF-1 и, как следствие, к увеличению экспрессии CCL2 [59].

ПОПУЛЯЦИОННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОСПРИИМЧИВОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ К ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Наиболее достоверная ассоциация генотипа с устойчивостью или восприимчивостью к ВИЧ-инфекции показана для аллелей CCR5Δ32 (rs333), CCR2-64I (rs1799864) и SDF1-3'A (rs1801157). Защитный эффект аллелей CCR5Δ32 и CCR2-64I имеет доминантный, а SDF1-3'A – рецессивный характер [2, 4–9, 60]. Эффект проявляется в устойчивости носителей определенных сочетаний аллелей указанных генов к ВИЧ-инфекции, а также в замедлении развития СПИДа. В различных расах и популяциях защитные аллели представлены гетерогенно, поэтому выяснение особенностей их распределения является одним из важных параметров, характеризующих эпидемиологические особенности данного региона или этнической группы. В широкомасштабных исследова-

дованиях эпидемиологических когорт, состоящих из представителей различных рас, было оценено влияние указанных протективных аллельных вариантов на динамику развития симптомов СПИДа и смертность в группах ВИЧ-инфицированных пациентов. На основании полученных данных были рассчитаны коэффициенты, характеризующие относительный риск развития заболевания по тому или иному сценарию в зависимости от генотипа [1–10].

Россия является одним из наиболее многонациональных государств, где проживают представители двух рас – европеоидной и монголоидной, включающие большое количество этнических и субэтнических групп. В ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России были выполнены исследования особенностей распределения протективных аллелей на территории России и ряда стран СНГ [2–5, 10]. Проведен анализ образцов ДНК, полученных от здоровых ВИЧ-неинфицированных взрослых представителей 10 этнических групп, не связанных кровным родством: коренного населения Архангельской области (поморы), Вологодской области, гагаузов, украинцев, татар, удмуртов, чеченцев, казахов, киргизов и тувинцев. В каждом образце определяли наличие аллелей CCR5D32, CCR2-64I и SDF1-3'A.

Аллель CCR5D32 наиболее часто представлен в группе поморов. Здесь высока доля гомозиготных генотипов, связанных с пониженным риском ВИЧ-инфекции, а также гетерозиготных генотипов, ассоциированных с замедленным развитием заболевания. В изученных Восточно-Европейских популяциях частота аллеля CCR5D32 совпадает со средними значениями, характерными для Центральной Европы. Этот аллель одинаково представлен в группах украинцев, русских из Вологодской области и гагаузов. Наименьшая частота аллеля CCR5D32 была отмечена в популяциях тувинцев, казахов, киргизов и чеченцев (центральноазиатская и северо-кавказская группы).

Казахи и киргизы принадлежат к южно-сибирской этнической группе, сформированной с участием европеоидной и монголоидной рас, а тувинцы являются представителями монголоидной расы. В этих случаях полученные данные соотносятся с результатами проводимых ранее исследований, демонстрирующих низкую распространенность варианта CCR5D32 в популяциях азиатского региона [24]. В выборках чеченцев, татар и удмуртов отмечены пониженные частоты аллеля CCR5D32 по сравнению с восточно-европейскими популяциями. Таким образом, распределение аллеля CCR5D32 в изученных регионах,

как и в изученных ранее популяциях Европы и Азии, характеризуется отрицательным градиентом в направлении с севера на юго-восток.

Гетерогенность распределения протективного аллеля CCR5D32 на территории изученных регионов связана, в первую очередь, с участием европеоидного и монголоидного компонентов в этногенезе народов, проживающих на территории России. Полученные нами результаты подтверждают и дополняют существующие данные молекулярно-генетического анализа пространственной структуры генофонда восточно-европейских и центральноазиатских народов.

В отношении аллеля CCR2-64I наиболее значимые отличия от других групп были обнаружены в популяциях казахов и киргизов (центральноазиатская группа). В популяции чеченцев частота аллеля ниже, чем в центральноазиатской группе, однако выше относительно других рассмотренных выборок. В пределах Восточно-Европейской и Волго-Уральской этнографических групп обнаружены достоверные отличия для гагаузов относительно других популяций. Эти данные коррелируют с данными о миграционных потоках со стороны южных регионов Европы (Греция, Болгария), где частота аллеля CCR2-64I повышена. Значимых отличий в других этнических группах Восточно-Европейского региона не обнаружено. В популяции тувинцев частота аллеля CCR2-64I зафиксирована на самом низком уровне. Причиной этому могла послужить как географическая изолированность республики, так и этническая близость к монголам (старое название региона – Бурято-Монголия). Полученные данные позволяют предположить, что формирование генофонда тувинской популяции находилось под влиянием миграционных потоков, проникавших на территорию Восточной Сибири из южных областей азиатского региона, где частота полиморфизма CCR2-64I ниже, чем в Центральной Азии.

Аллель SDF1-3'A в исследованных популяциях распространен равномерно. Единственное значимое отличие отмечено для популяции гагаузов, где частота аллеля несколько выше, чем у представителей других изученных популяций. Изменение частот аллелей CCR2-64I и SDF1-3'A совпадает с существующими представлениями о направлении миграционных потоков на территории Азиатского региона. По одной из существующих на сегодняшний день гипотез, предки проживающих в этом регионе людей попали на территорию Центральной Азии с юга, вероятно из Юго-Восточной Азии (где частота аллеля SDF1-3'A высокая), и в дальнейшем распростра-

нились на север Азии. Последующие миграции на территории Китая были направлены с севера на юг, из области с высокой частотой CCR2-64I. Противоположная направленность в распределении частот протективных аллелей CCR2-64I и SDF1-3'A на территории Азиатского региона отчасти подтверждает эту гипотезу [3–5, 10, 24].

На основе частот трехлокусных генотипов в изученных популяциях и значений коэффициентов относительных рисков были рассчитаны значения относительного риска развития СПИДа (ОРР) и смерти от СПИДа (ОРС) у ВИЧ-инфицированных индивидуумов. В рассмотренных нами группах значения ОРР и ОРС находятся в диапазонах 0,79–0,94 и 0,76–0,93 соответственно. В целом это соответствует данным, полученным для других популяций Европы и Азии. Широкое распространение аллеля CCR2-64I в центрально-азиатской группе, а также высокая частота аллеля CCR5D32 в выборке русских из Архангельской области определили пониженные значения ОРР и ОРС в этих группах. Напротив, в выборке тувинцев и популяциях Волго-Уральской группы ОРР и ОРС имеют повышенные значения, что связано с низкой частотой протективных аллелей CCR5D32 и CCR2-64I. У восточно-европейских народов и в группе чеченцев выявлен средний уровень ОРР и ОРС. Можно предположить, что в первом случае оказывает влияние распространенность аллеля CCR5D32, а во втором – CCR2-64I.

Гетерогенность распределения аллелей, ассоциированных с устойчивостью или чувствительностью к ВИЧ-инфекции (СПИДу), в значительной степени варьирует в различных расах и популяциях, что влияет на динамику развития эпидемии в разных регионах мира и различных популяциях. В связи с этим представляется важным дальнейшее изучение существующих и поиск новых генетических факторов устойчивости к ВИЧ-инфекции (СПИДу), а также расширение географии исследования. Целесообразность таких исследований определяется как фундаментальной значимостью, так и выраженным прикладным аспектом, поскольку их результаты открывают новые возможности в формировании целевых стратегий эпидемиологического прогнозирования, а также повышения эффективности профилактики и лечения ВИЧ-инфекции (СПИДа).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Limou S., Le Clerc S., Coulonges C., Carpentier W., Dina C., Delaneau O., Labib T., Taing L., Sladek R., Deveau C., Ratsimandresy R., Montes M., Spadoni J.L., Lelievre J.D., Levy Y., Therwath A., Schachter F., Matsuda F., Gut I., Froguel P., Delfraissy J.F., Hercberg S., Zagury J.F. Genomewide Association Study of an AIDS-Nonprogression Cohort Emphasizes the Role Played by HLA Genes (ANRS Genomewide Association Study 02). *J. Infect. Dis.* 2009; 199 (3): 419–426. DOI: 10.1086/596067.
2. Хаитов Р.М. СПИД. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018: 496. [Khaitov R.M. AIDS. 2nd edition, revised and supplemented. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2018: 496 (in Russ.).]
3. Кофиади И.А., Ребриков Д.В., Трофимов Д.Ю., Алексеев Л.П., Хаитов Р.М. Распределение аллелей генов CCR5, CCR2, и SDF1, ассоциированных с устойчивостью к ВИЧ-инфекции, в российских популяциях. *Докл. акад. наук.* 2007; 415 (6): 842–845. [Kofiad I.A., Rebrikov D.V., Trofimov D.Y., Alexeev L.P., Khaitov R.M. Allelic distribution of the CCR5, CCR2, and SDF1 gene polymorphisms associated with HIV-1/AIDS resistance in Russian populations. *Dokl. Biol. Sci.* 2007; 415 (6): 842–845 (in Russ.)]. DOI: 10.1134/s0012496607040217.
4. Кофиади И.А., Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Сидорович И.Г., Карамов Э.В. Генетический полиморфизм человека и устойчивость к ВИЧ/СПИДу. Популяционный аспект. *Иммунология.* 2009; 30 (4): 196–200. Kofiad I.A., Khaitov R.M., Alekseev L.P., Sidorovich I.G., Karamov E.V. Human genetic polymorphism and resistance to HIV/AIDS. Population aspect. *Immunology.* 2009; 30 (4): 196–200 (in Russ.).]
5. Govorovskaya I., Khromova E., Suslova T., Alexeev L., Kofiad I. The Frequency of CCR5del32 Mutation in Populations of Russians, Tatars and Bashkirs of Chelyabinsk Region, Russia. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 2016; 64 (Suppl. 1): 109–112. DOI: 10.1007/s00005-016-0429-3.
6. Fellay J., Ge D., Shianna K.V., Colombo S., Ledergerber B., Cirulli E.T., Urban T.J., Zhang K., Gumbs C.E., Smith J.P., Castagna A., Cozzi-Lepri A., De Luca A., East-erbrook P., Günthard H.F., Mallal S., Mussini C., Dalmay J., Martinez-Picado J., Miro J.M., Obel N., Wolinsky S.M., Martinson J.J., Detels R., Margolick J.B., Jacobson L.P., Descombes P., Antonarakis S.E., Beckmann J.S., O'Brien S.J., Letvin N.L., McMichael A.J., Haynes B.F., Carrington M., Feng S., Telenti A., Goldstein D.B. Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans. *PLoS Genet.* 2009; 5 (12): e1000791. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000791.
7. An P., Winkler C.A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet.* 2010; 26 (3): 119–131. DOI: 10.1016/j.tig.2010.01.002.
8. Van Manen D., van Wout A.B., Schuitemaker H. Genome-wide association studies on HIV susceptibility, pathogenesis and pharmacogenomics. *Retrovirology.* 2012; 9: 70. DOI: 10.1186/1742-4690-9-70.
9. Shea P.R., Shianna K.V., Carrington M., Goldstein D.B. Host genetics of HIV acquisition and viral control. *Annu Rev Med.* 2013; 64: 203–217. DOI: 10.1146/annurev-med-052511-135400.

10. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Иммуногенетика и биобезопасность. М.: ООО «Миттель-Пресс», 2014: 232. [Khaitov R.M., Alexeev L.P. Immunogenetics and biosafety. Moscow: Mittel-Press Publ., 2014: 232 (in Russ.).]
11. McLaren P.J., Carrington M. The impact of host genetic variation on infection with HIV-1. *Nat Immunol.* 2015; 16 (6): 577–583. DOI: 10.1038/ni.3147.
12. McLaren P.J., Fellay J. Human genetic variation in HIV disease: beyond genome-wide association studies. *Curr Opin HIV AIDS.* 2015; 10 (2): 110–115. DOI: 10.1097/COH.0000000000000133.
13. McDermott D.H., Beecroft M.J., Kleeberger C.A., Al-Sharif F.M., Ollier W.E., Zimmerman P.A., Boatn B.A., Leitman S.F., Detels R., Hajeer A.H., Murphy P.M. Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS.* 2000; 14 (17): 2671–2678. DOI: 10.1097/00002030-200012010-00006.
14. An P., Nelson G.W., Wang L., Donfield S., Goedert J.J., Phair J., Vlahov D., Buchbinder S., Farrar W.L., Modi W., O'Brien S.J., Winkler C.A. Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99 (15): 10002–10007. DOI: 10.1073/pnas.142313799.
15. Duggal P., Winkler C.A., An P., Yu X.F., Farzadegan H., O'Brien S.J., Beaty T.H., Vlahov D. The effect of RANTES chemokine genetic variants on early HIV-1 plasma RNA among African American injection drug users. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2005; 38 (5): 584–589. DOI: 10.1097/01.qai.0000134741.49208.03.
16. Sierra S., Kaiser R., Thielen A., Lengauer T. Genotypic coreceptor analysis. *Eur. J. Med. Res.* 2007; 12 (9): 453–462. DOI: 10.1007/978-3-540-78358-9_4.
17. Zou Y.R., Kottmann A.H., Kuroda M., Taniuchi I., Littman D.R. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature.* 1998; 393 (6685): 595–599. DOI: 10.1038/31269.
18. Chen M., Svicher V., Artese A., Costa G., Alteri C., Ortuso F., Parrotta L., Liu Y., Liu C., Perno C.F., Alcaro S., Zhang J. Detecting and understanding genetic and structural features in HIV-1 B subtype V3 underlying HIV-1 co-receptor usage. *Bioinformatics.* 2013; 29 (4): 451–460. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt002.
19. O'Brien S.J., Moore J.P. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol. Rev.* 2000; 177: 99–111. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2000.17710.x.
20. Arenzana-Seisdedos F., Parmentier M. Genetics of resistance to HIV infection: role of co-receptors and co-receptor ligands. *Semin. Immunol.* 2006; 18 (6): 387–403. DOI: 10.1016/j.smim.2006.07.007.
21. Waters L., Mandalia S., Randell P., Wildfire A., Gazzard B., Moyle G. The impact of HIV tropism on decreases in CD4 cell count, clinical progression, and subsequent response to a first antiretroviral therapy regimen. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 46 (10): 1617–1623. DOI: 10.1086/587660.
22. Sheppard H.W., Celum C., Michael N.L. et al. HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32 / Delta32 genotype: acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2002; 29 (3): 307–313. DOI: 10.1097/00042560-200203010-00013.
23. Woodham A.W., Skeate J.G., Sanna A., Taylor J.R., Da Silva D.M., Cannon P.M., Kast W.M. Human immunodeficiency virus immune cell receptors, coreceptors, and cofactors: implications for prevention and treatment. *AIDS Patient Care STDS.* 2016; 30 (7): 291–306. DOI: 10.1089/apc.2016.0100.
24. Su B., Sun G., Lu D., Xiao J., Hu F., Chakraborty R., Deka R., Jin L. Distribution of three HIV-1 resistance-conferring polymorphisms (SDF1-3'A, CCR2-641, and CCR5-delta32) in global populations. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000; 8 (12): 975–979. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200568.
25. Kuhmann S.E., Platt E.J., Kozak S.L., Kabat D. Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2000; 74 (15): 7005–7015. DOI: 10.1128/jvi.74.15.7005-7015.2000.
26. Nakayama E.E., Tanaka Y., Nagai Y., Iwamoto A., Shioda T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS.* 2004; 18 (5): 729–738. DOI: 10.1097/00002030-200403260-00003.
27. Lama J., Planelles V. Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression. *Retrovirology.* 2007; 4: 52. DOI: 10.1186/1742-4690-4-52.
28. Pereyra F., Addo M.M., Kaufmann D.E. et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 2008; 197 (4): 563–571. DOI: 10.1086/526786.
29. He W., Neil S., Kulkarni H., Wright E., Agan B.K., Marconi V.C., Dolan M.J., Weiss R.A., Ahuja S.K. Duffy antigen receptor for chemokines mediates trans-infection of hiv-1 from red blood cells to target cells and affects HIV-AIDS Susceptibility. *Cell Host Microbe.* 2008; 4 (1): 52–62. DOI: 10.1016/j.chom.2008.06.002.
30. Murakami T., Yamamoto N. Roles of chemokines and chemokine receptors in HIV-1 infection. *Int. J. Hematol.* 2000; 72 (4): 412–417.
31. Fogel G.B., Lamers S.L., Liu E.S., Salemi M., McGrath M.S. Identification of dual-tropic HIV-1 using evolved neural networks. *Biosystems.* 2015; 137: 12–19. DOI: 10.1016/j.biosystems.2015.09.007.
32. Duncan C.J., Sattentau Q.J. Viral determinants of HIV-1 macrophage tropism. *Viruses.* 2011; 3 (11): 2255–2279. DOI: 10.3390/v3112255.
33. McGreal E., Miller J., Gordon S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; 17 (1): 18–24. DOI: 10.1016/j.coi.2004.12.001.
34. Geijtenbeek T.B., Kwon D.S., Torensma R., van Vliet S.J., van Duijnhoven G.C., Middle J., Cornelissen I.L., Not-

- tet H.S., KewalRamani V.N., Littman D.R., Figdor C.G., van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000; 100 (5): 587–597. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80694-7.
35. Van den Berg L.M., Geijtenbeek T.B. Antiviral immune responses by human langerhans cells and dendritic cells in HIV-1 infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013; 762: 45–70. DOI: 10.1007/978-1-4614-4433-6_2.
 36. Ji X., Gewurz H., Spear G.T. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol. Immunol.* 2005; 42 (2): 145–152. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.06.015.
 37. Hadley T.J., Peiper S.C. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood*. 1997; 89 (9): 3077–3091. DOI: 0006-4971/97/8909-0030.
 38. Fukuma N., Akimitsu N., Hamamoto H., Kusuvara H., Sugiyama Y., Sekimizu K. A role of the Duffy antigen for the maintenance of plasma chemokine concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 303 (1): 137–139. DOI: 10.1016/S0006-291X(03)00293-6.
 39. Woolley I.J., Hotmire K.A., Sramkoski R.M., Zimmerman P.A., Kazura J.W. Differential expression of the duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and FY genotype. *Transfusion*. 2000; 40 (8): 949–953. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2000.40080949.x.
 40. Chakera A., Seeber R.M., John A.E., Eidne K.A., Greaves D.R. The duffy antigen/receptor for chemokines exists in an oligomeric form in living cells and functionally antagonizes CCR5 signaling through hetero-oligomerization. *Mol. Pharmacol.* 2008; 73 (5): 1362–1370. DOI: 10.1124/mol.107.040915.
 41. Pruenster M., Mudde L., Bombosi P., Dimitrova S., Zsak M., Middleton J., Richmond A., Graham G.J., Segerer S., Nibbs R.J., Rot A. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat. Immunol.* 2009; 10 (1): 101–108. DOI: 10.1038/ni.1675.
 42. Schnabel R.B., Baumert J., Barbalic M., Dupuis J., Ellinger P.T., Durda P., Dehghan A., Bis J.C., Illig T., Morrison A.C., Jenny N.S., Keaney J.F. Jr., Gieger C., Tillet C., Yamamoto J.F., Khuseynova N., Heiss G., Doyle M., Blankenberg S., Herder C., Walston J.D., Zhu Y., Vasan R.S., Klopp N., Boerwinkle E., Larson M.G., Psaty B.M., Peters A., Ballantyne C.M., Witteman J.C., Hoogeveen R.C., Benjamin E.J., Koenig W., Tracy R.P. Duffy antigen receptor for chemokines (Darc) polymorphism regulates circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and other inflammatory mediators. *Blood*. 2010; 115 (26): 5289–5299. DOI: 10.1182/blood-2009-05-221382.
 43. Voruganti V.S., Laston S., Haack K., Mehta N.R., Smith C.W., Cole S.A., Butte N.F., Comuzzie A.G. Genome-wide association replicates the association of Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) polymorphisms with serum monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) levels in Hispanic children. *Cytokine*. 2012; 60 (3): 634–638. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.08.029.
 44. Kulkarni H., Marconi V.C., He W., Landrum M.L., Okulich J.F., Delmar J., Kazandjian D., Castiblanco J., Ahuja S.S., Wright E.J., Weiss R.A., Clark R.A., Dolan M.J., Ahuja S.K. The Duffy-null state is associated with a survival advantage in leukopenic HIV-infected persons of African ancestry. *Blood*. 2009; 114 (13): 2783–2392. DOI: 10.1182/blood-2009-04-215186.
 45. Ramsuran V., Kulkarni H., He W., Mlisana K., Wright E.J., Werner L., Castiblanco J., Dhanda R., Le T., Dolan M.J., Guan W., Weiss R.A., Clark R.A., Karim S.S., Ahuja S.K., Ndung'u T. Duffy-null-associated low neutrophil counts influence HIV-1 susceptibility in high-risk south african black women. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 52 (10): 1248–1256. DOI: 10.1093/cid/cir119.
 46. Zhao J., She S., Xie L., Chen X., Mo C., Huang L., Tang W., Chen X. The Effects of RANTES polymorphisms on susceptibility to hiv-1 infection and disease progression: evidence from an updated meta-analysis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2016; 32 (6): 517–528. DOI: 10.1089/AID.2015.0312.
 47. Gong Z., Tang J., Xiang T., Zhang L., Liao Q., Liu W., Wang Y. Association between regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted (RANTES) –28C/G polymorphism and susceptibility to HIV-1 infection: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013; 8 (4): e60683. DOI: 10.1371/journal.pone.0060683.
 48. Modi W.S., Lautenberger J., An P., Scott K., Goedert J.J., Kirk G.D., Buchbinder S., Phair J., Donfield S., O'Brien S.J., Winkler C. Genetic variation in the CCL18-CCL3-CCL4 chemokine gene cluster influences HIV Type 1 transmission and AIDS disease progression. *Am. J. Hum. Genet.* 2006; 79 (1): 120–128. DOI: 10.1086/505331.
 49. Arenzana-Seisdedos F. SDF-1/CXCL12: A Chemokine in the life cycle of HIV. *Front Immunol.* 2015; 6: 256. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00256.
 50. Yu L., Cecil J., Peng S. B., Schrementi J., Kovacevic S., Paul D., Su E. W., Wang J. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*. 2006; 374: 174–179. DOI: 10.1016/j.gene.2006.02.001.
 51. Celerino da Silva R., Victor Campos Coelho A., Cláudio Arraes L., André Cavalcanti Brandão L., Lima Guimarães R., Crovella S. Chemokines SNPs in HIV-1+ Patients and healthy controls from northeast brazil: association with protection against HIV-1 infection. *Curr. HIV Res.* 2016; 14 (4): 340–345. DOI: 10.2174/1570162X14666160120152237.
 52. Aklillu E., Odenthal-Hesse L., Bowdrey J., Habtewold A., Ngaimisi E., Yimer G., Amogne W., Mugusi S., Minzi O., Makonnen E., Janabi M., Mugusi F., Aderaye G., Hardwick R., Fu B., Viskaduraki M., Yang F., Hollox E.J. CCL3L1 copy number, HIV load, and immune reconsti-

- tution in sub-Saharan Africans. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 536. DOI: 10.1186/1471-2334-13-536.
53. Dolan M.J., Kulkarni H., Camargo J.F., He W., Smith A., Anaya J.M., Miura T., Hecht F.M., Mamtani M., Pereyra F., Marconi V., Mangano A., Sen L., Bologna R., Clark R.A., Anderson S.A., Delmar J., O'Connell R.J., Lloyd A., Martin J., Ahuja S.S., Agan B.K., Walker B.D., Deeks S.G., Ahuja S.K. CCL3L1 and CCR5 influence cell-mediated immunity and affect HIV-AIDS pathogenesis via viral entry-independent mechanisms. *Nat. Immunol.* 2007; 8 (12): 1324–1336. DOI: 10.1038/ni1521.
 54. Bystry R.S., Aluvihare V., Welch K.A., Kallikourdis M., Betz A.G. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat. Immunol.* 2001; 2 (12): 1126–1132. DOI: 10.1038/ni735.
 55. Kamin-Lewis R., Abdelwahab S.F., Trang C., Baker A., DeVico A.L., Gallo R.C., Lewis G.K. (July). Perforin-low memory CD8+ cells are the predominant T cells in normal humans that synthesize the β -chemokine macrophage inflammatory protein-1 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98 (16): 9283–9288. DOI: 10.1073/pnas.161298998.
 56. Covino D.A., Sabbatucci M., Fantuzzi L. The CCL2/CCR2 axis in the pathogenesis of HIV-1 infection: a new cellular target for therapy? *Curr. Drug Targets.* 2016; 17 (1): 76–110. DOI: 10.2174/138945011701151217110917.
 57. Sabbatucci M., Covino D.A., Purificato C., Mallano A., Federico M., Lu J., Rinaldi A.O., Pellegrini M., Bona R., Michelini Z., Cara A., Vella S., Gessani S., Andreotti M., Fantuzzi L. Endogenous CCL2 neutralization restricts HIV-1 replication in primary human macrophages by inhibiting viral DNA accumulation. *Retrovirology.* 2015; 12: 4. DOI: 10.1186/s12977-014-0132-6.
 58. Singh K.K., Hughes M.D., Chen J., Spector S.A. Impact of MCP-1-2518-G allele on the HIV-1 disease of children in the United States. *AIDS.* 2006; 20 (3): 475–478. DOI: 10.1097/01.aids.0000200540.09856.58
 59. Mummidi S., Bonello G.B., Ahuja S.K. Confirmation of differential binding of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) to the functional and HIV disease-influencing –2578 A/G polymorphism in CCL2. *Genes Immun.* 2009; 10 (2): 197–198. DOI: 10.1038/gene.2008.75.
 60. Moore J.P., Kitchen S.G., Pugach P., Zack J.A. The CCR5 and CXCR4 coreceptors-central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 2004; 20 (1): 111–126. DOI: 10.1089/088922204322749567.

Сведения об авторах

Хайтов Рахим Мусаевич, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель Института иммунологии, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-3064-8871.

Алексеев Леонид Петрович, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, зав. отделом, Институт иммунологии, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-0432-9439.

Кофиади Илья Андреевич, д-р биол. наук, зав. лабораторией, Институт иммунологии, г. Москва. ORCID iD 0000-0001-9280-8282.

Гудима Георгий Олегович, д-р биол. наук, зав. лабораторией, Институт иммунологии, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-2864-6949.

(✉) **Гудима Георгий Олегович**, e-mail: goudima@mail.ru.

Authors information

Khaitov Rahim M., DM, Professor, Academician of the RAS, Scientific Director of the Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3064-8871.

Alekseev Leonid P., DM, Professor, Corresponding Member of the RAS, Head of the Department, Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0432-9439.

Kofiadi Ilya A., DBSc, Head of the Laboratory, Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-9280-8282.

Gudima Georgy O., DBSc, Head of the Laboratory, Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2864-6949.

(✉) **Gudima Georgy O.**, e-mail: goudima@mail.ru.

Поступила в редакцию 13.09.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Received 13.09.2018

Accepted 17.12.2018

Макрофаги при бактериальных болезнях легких: фенотип и функции (обзор)

Чурина Е.Г.^{1,2}, Ситникова А.В.¹, Уразова О.И.^{1,3}, Чумакова С.П.¹,
Винс М.В.¹, Береснева А.Е.¹, Новицкий В.В.^{1,3}

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

³ Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники (ТУСУР)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 40

РЕЗЮМЕ

Обзор литературы посвящен анализу роли макрофагов в иммунопатогенезе инфекционных заболеваний легких бактериальной этиологии. В статье обобщены сведения о происхождении макрофагов, их фенотипической и функциональной гетерогенности. Механизмы нарушений защитной функции врожденного иммунитета связаны с поляризацией программы созревания и активации макрофагов в направлении толерогенных или иммунорегуляторных клеток с фенотипом М2. Альвеолярные макрофаги выполняют разнообразные функции (от провоспалительной до регенераторной) при развитии воспаления в органах дыхания. Присущая им пластичность свидетельствует, что одни и те же макрофаги могут изменять свой фенотип и функции в зависимости от микроокружения в очаге воспаления на разных стадиях заболевания. Понимание механизмов, которые регулируют пластичность макрофагов, станет важным шагом на пути реализации потенциала персонализированной иммуномодулирующей терапии.

Ключевые слова: макрофаги, моноциты, альвеолярные макрофаги, заболевания легких, врожденный иммунитет, иммунный ответ.

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

Источники финансирования. Гранты РФФИ (№ 18-015-00160\18) и Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7, № 075-02-2018-538).

Для цитирования: Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Уразова О.И., Чумакова С.П., Винс М.В., Береснева А.Е., Новицкий В.В. Макрофаги при бактериальных болезнях легких: фенотип и функции (обзор). *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 142–154. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-142-154>.

УДК 616.24-022.7-008.853.3:577.27

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-142-154>

Macrophages in bacterial lung diseases: phenotype and functions (review)

Churina E.G.^{1,2}, Sitnikova A.V.¹, Urazova O.I.^{1,3}, Chumakova S.P.¹,
Vins M.V.¹, Beresneva A.E.¹, Novitskiy V.V.^{1,3}

¹ Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634055, Russian Federation

² National Research Tomsk State University (NR TSU)
36, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

³ Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics (TUSUR)
40, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

This literature review is devoted to the analysis of the role of macrophages in the immunopathogenesis of infectious lung diseases of bacterial etiology. The article summarizes information about the origin of macrophages, their phenotypic and functional heterogeneity. The mechanisms of impaired protective function of innate immunity are associated with the polarization of the program of maturation and activation of macrophages in the direction to tolerogenic or immunoregulatory cells with phenotype of M2. Alveolar macrophages perform a variety of functions (from pro-inflammatory to regenerative) in the development of inflammation in the respiratory organs. Their inherent plasticity suggests that the same macrophages can change their phenotype and function depending on the microenvironment in the inflammatory focus at different stages of the disease. Understanding the mechanisms that regulate macrophage plasticity will be an important step towards realizing the potential of personalized immunomodulatory therapy.

Key words: macrophages, monocytes, alveolar macrophages, lung diseases, innate immunity, immune response.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. Grants of the Russian Foundation for Basic Research (No. 18-015-00160 \ 18) and the Council on Grants of the President of the Russian Federation for leading scientific schools (NSH-2690.2018.7, No. 075-02-2018-538).

For citation: Churina E.G., Sitnikova A.V., Urazova O.I., Chumakova S.P., Vins M.V., Beresneva A.E., Novitskiy V.V. Macrophages in bacterial lung diseases: phenotype and functions (review). *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 142–154. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-142-154>.

ВВЕДЕНИЕ

Нобелевская премия 2011 г. в номинации «Физиология и медицина» позволила окончательно сформировать новые представления о механизмах активации врожденного иммунитета, роли дендритных клеток и макрофагов в формировании иммунологической толерантности, их регулирующем влиянии на адаптивный иммунный ответ. Происхождение и функции макрофагов и дендритных клеток (DC) во многом схожи, однако отличительной особенностью DC является их уникальная функция первичной презентации

антигенов Т-клеткам и участие в формировании иммунологической толерантности. Макрофаг – ключевая антигенпрезентирующая клетка врожденного иммунитета, которая при классической активации поддерживает течение острого и хронического воспалительного Т-клеточного иммунного ответа, одновременно осуществляя эффекторную функцию (M1-макрофаги). Однако в случае альтернативной активации и приобретения макрофагами толерогенного фенотипа (M2, или M2-like-макрофаги) происходит их функциональная перестройка, и они, блокируя передачу активационного сигнала внутри Т-клетки, начи-

нают выполнять иммуносупрессорную функцию, способствуют фиброгенезу, пролиферативным процессам и регенерации тканей [1, 2].

Система мукозального иммунитета респираторного тракта морфологически представлена бронхоальвеолярной лимфоидной тканью (BALT), структурными элементами которой являются альвеолярные макрофаги (АМ), DC, лимфоциты, гамма-дельта-Т-клетки, лимфоидные клетки врожденного иммунитета (ILC), антимикробные пептиды, белки внеклеточного матрикса. Очевидно, что АМ играют ключевую роль в успешной реализации механизмов мукозального иммунитета при проникновении патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (РАМР) и высокомолекулярных соединений (антигенов) в слизистые оболочки дыхательных путей. Макрофаги – фенотипически и функционально высокогетерогенная популяция клеток. Формирование фенотипа макрофагов, с одной стороны, может быть изначально предопределено на этапе дифференцировки моноцитов в костном мозге или непосредственно в крови под влиянием комплекса высвобождающихся в системный кровоток гуморальных факторов. С другой стороны, моноциты дифференцируются в макрофаги и DC в очаге воспаления, который является «истинной» территорией иммунного ответа в зависимости от природы антигена, локального цитокинового и клеточного микроокружения. При развитии иммунного ответа пластичность макрофагов обеспечивает возможность дальнейшей их конверсии и функционального перепрограммирования под влиянием широкого спектра молекулярно-клеточных факторов. В настоящем обзоре обобщены современные знания о видах, происхождении, функциях макрофагов и их роли в патогенезе различных заболеваний легких бактериальной этиологии.

К ВОПРОСУ О ПРОИСХОЖДЕНИИ И ФУНКЦИЯХ МАКРОФАГОВ

Макрофаги созревают из моноцитов, которые исходно образуются из CD34⁺ миелоидных клеток-предшественниц в костном мозге, циркулируют в крови и проникают в периферические ткани [3]. В циркулирующей крови моноциты составляют до 10% от общего количества лейкоцитов, как и макрофаги, фенотипически и функционально различаются между собой. С. Tsou и соавт. (2007) показали, что у мышей моноциты крови образуются в костном мозге из клеток-предшественниц макрофагов или DC (macrophage dendritic precursors, MDP), при этом хемокиновый рецептор

CCR2 и макрофагальный белок-хемоаттрактант 3 (macrophage chemotactic protein, MCP-3) способствуют мобилизации моноцитов из костного мозга [4]. Образующиеся из моноцитов макрофаги различаются в зависимости от степени зрелости, области локализации, а также от их активации антигенами или лимфоцитами. Макрофаги разделяются на фиксированные и свободные (подвижные). К подвижным, или блуждающим, относятся макрофаги соединительной ткани – гистиоциты. Различают макрофаги серозных полостей (перитонеальные и плевральные), АМ, макрофаги печени (купферовские клетки), макрофаги центральной нервной системы (глиальные макрофаги), остеокласты. Все эти формы макрофагов объединяются в систему мононуклеарных фагоцитов, клетки которой характеризуются разнообразием реагирования на изменяющиеся условия микроокружения [5].

Общеизвестный факт, что циркулирующие моноциты являются центральным источником пополнения пула тканевых макрофагов, недавно был поставлен под сомнение. В 2012 г. в Science впервые появилась публикация Кристиана Шульца и его научной группы. Авторами было вновь исследовано происхождение макрофагов и установлено, что некоторые макрофаги развиваются у эмбриона до появления первых гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) миелоидного происхождения. Показано, что фактор транскрипции Mub, необходимый для развития ГСК, всех моноцитов и макрофагов с фенотипом CD11b^{high} не требуется для развития макрофагов желточного мешка и их потомков – эмбриональных макрофагов ряда органов и тканей, из которых образуются клетки Купфера в печени, АМ, эпидермальные клетки Лангерганса, клетки микроглии, которые могут сохраняться и у взрослых мышей независимо от ГСК. Эти результаты свидетельствуют о наличии линии тканевых макрофагов, которые происходят из желточного мешка в эмбриогенезе и генетически отличаются от потомков ГСК [6].

Структурной особенностью макрофагов является выраженный лизосомальный аппарат, представленный большим количеством лизосом и фагосом, находящихся в цитоплазме. Особенностью гистиоцитов является наличие на их поверхности многочисленных складок, инвагинаций и псевдоподий, необходимых для миграции клеток и фагоцитоза [7].

Макрофаги, образовавшиеся из моноцитов в периферических тканях, находятся в неактивном состоянии, которое характеризуется низким потреблением кислорода, низкой скоростью син-

теза белка и умеренной продукцией цитокинов. Однако резидентные макрофаги могут быстро реагировать на действие стимулов окружающей среды путем существенного изменения характера экспрессии генов [8]. Активация макрофагов, к примеру, при повреждении ткани и развитии воспаления, сопровождается секрецией цитокинов, хемокинов и других медиаторов воспаления, которые, в свою очередь, способствуют привлечению новых макрофагов для реализации эффекторной фазы иммунного ответа [9].

Как указывалось выше, выделяют два типа активированных макрофагов: M1 (провоспалительный фенотип) и M2 (иммуномодулирующий и тканевый ремоделирующий фенотип). Такое обозначение аналогично классификации активированных Т-лимфоцитов на Т-хелперы 1-го (Th1) и 2-го (Th2) типов и в некоторой степени подчеркивает связь макрофагов определенного фенотипа с реализацией соответствующего типа адаптивного иммунного ответа [10]. В 2014 г. P.J. Murray и соавт. предложили номенклатуру макрофагов и представили методические рекомендации по их культивированию и воспроизведению дифференцировки M1- и M2-субпопуляций в лабораторных условиях *in vitro* [11]. Однако классификация макрофагов, несомненно, нуждается в дальнейшей доработке.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ МОНОЦИТОВ И МАКРОФАГОВ

Известно, что моноциты периферической крови функционально неоднородны и обладают различным эффекторным потенциалом. Среди моноцитов различают «классические» CD14⁺⁺CD16⁻ клетки, предназначенные для фагоцитоза, «промежуточные» моноциты CD14⁺⁺CD16⁺, осуществляющие иммунорегуляторную функцию и взаимодействие с Т-лимфоцитами, и «неклассические» клетки CD14⁺CD16⁺⁺, обладающие высоким аффинитетом к эндотелию и получившие название «патрулирующих» [12]. Первая субпопуляция моноцитов активно секретирует интерлейкин (IL) 6, IL-8, IL-10; вторая – IL-8 и чуть меньше IL-1β, IL-6; последняя – преимущественно IL-1β, IL-8, фактор некроза опухоли (TNF) α и в меньшей степени IL-6. В тканях моноциты трансформируются в макрофаги. При этом точно неизвестно, как соотносятся между собой субпопуляции моноцитов и макрофагов. Предполагается, что за счет классических моноцитов пополняется пул резидентных макрофагов, промежуточные клетки дифферен-

цируются в DC миелоидного происхождения, а неклассические моноциты – в провоспалительные макрофаги [13].

«Классическая» активация макрофагов, приводящая к поляризации их созревания в направлении M1-клеток, индуцируется интерфероном (IFN) γ, продуцируемым активированными CD4⁺ лимфоцитами и натуральными киллерами (NK), а также другими провоспалительными медиаторами, такими как TNFα и бактериальный липополисахарид (LPS) [14]. Как правило, M1-макрофаги отличаются выраженной цитотоксической и антимикробной активностью, опосредованной продукцией активных форм кислорода, азота и провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23, TNFα), характеризуются низкой секрецией IL-10. Макрофаги первого типа индуцируют Th1-ответ и обеспечивают защиту от внутриклеточных патогенов и опухолевых клеток [15]. Основными факторами дифференцировки и гуморальными продуктами регуляторных M2-макрофагов являются CCL18, IL-4, IL-10 и трансформирующий фактор роста (TGF) β. CCL18 – это белок, принадлежащий к семейству CC-хемокинов. Первоначально CCL18 был известен как AMAC-1 (alternative macrophage activation-associated CC chemokine-1). Он продуцируется макрофагами и DC врожденного иммунитета, способствует дифференцировке моноцитов в M2-макрофаги, а также является их специфическим маркером и секреторным продуктом [16–19]. Секреция M2-макрофагами TGFβ определяет их участие в фиброгенезе и хроническом пролиферативном воспалении. Различные формы макрофагов с фенотипом M2 характеризуются низкой продукцией IL-12 и IL-23, экспрессируют большое количество фагоцитарных рецепторов маннозного и галактозного типа [20–22].

Если классический фенотип активированных M1-макрофагов хорошо описан в литературе, то данные относительно клеток с фенотипом M2 достаточно противоречивы. Часто альтернативно активированные M2-макрофаги разделяют на три субпопуляции: M2a, M2b и M2c [23].

Макрофаги с фенотипом M2a дифференцируются при действии IL-4 или IL-13. Они участвуют в активации реакций Th2-зависимого иммунного ответа. Показано, что M2a-клетки играют основную роль в противогельминтном иммунном ответе, пролиферации соединительной ткани и заживлении ран при повреждении гельминтами, а также способствуют привлечению эозинофилов в очаг поражения паразитами (возможно, за счет выделения лейкотриена B₄) [24]. Фенотип M2b

формируется при действии иммунных комплексов в сочетании с IL-1 β или LPS, при этом поляризация макрофагов связана с активацией toll-like рецепторов (TLR) и рецептора к IL-1 (IL-1R). Макрофаги с фенотипом M2b участвуют в регуляции (подавлении) иммуновоспалительных процессов, способствуют активации Th2-зависимых реакций. Образование клеток с фенотипом M2c происходит под влиянием IL-10, TGF β или глюкокортикоидов. Макрофаги типа M2c активируют синтез межклеточного матрикса и участвуют в ремоделировании тканей. Макрофаги с фенотипами M2a и M2b обычно проявляют противовоспалительную активность. Макрофаги типа M2c обладают большим сходством с M1-макрофагами за исключением того, что вместо провоспалительных цитокинов секретируют IL-10 [20, 24].

Функциональный фенотип моноцитов и макрофагов пластичен и определяется экспрессией поверхностных рецепторов и профилем образуемых цитокинов (экспрессия генов цитокинов, содержание цитокинов внутри клетки и уровень их секреции во внеклеточную среду), активацией ядерных транскрипционных факторов сигнальных путей, природой антигена, его иммуногенностью, локальным цитокиновым статусом микроокружения клеток [2, 25, 26]. Рецепторы являются ключевыми в функциональном отношении мембранными молекулами моноцитов/макрофагов. К ним относятся TLR, предназначенные для распознавания PAMP, и рецепторы лектиновой группы, в частности маннозный рецептор (CD206), характерный для M2-макрофагов и слабо экспрессирующийся на моноцитах. И на моноцитах, и на макрофагах (преимущественно M1) присутствуют лектиновые рецепторы DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) – CD209 и лектин-1. Функционально важную группу поверхностных молекул моноцитов (макрофагов) составляют молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) и костимуляции. Экспрессия молекул МНС типа II усиливается при активации клеток, в роли костимулирующих выступают молекулы CD80 и CD86, которые принято считать маркерами M1-макрофагов. CD86 появляется на поверхности клетки только после активации, а CD80 экспрессируется конститутивно, но при получении активационного сигнала ее экспрессия повышается [20, 27, 28].

Наибольший интерес представляют scavenger-рецепторы («мусорщики»), к которым, в частности, относятся молекула MSR (macrophage scavenger receptor) – CD36, обладающая родством к коллагену, маннозный рецептор CD206,

stabilin-1 (опосредует процессы поглощения фагоцитируемых объектов и их транспорт в эндосомально-лизосомальную систему), SR-A (CD204), SR-MARCO (экспрессируется преимущественно на резидентных макрофагах), общий мембранный маркер M1- и M2-макрофагов CD68 и др. [29–34].

Интересно, что M1- и M2-макрофаги различаются по профилю экспрессируемых хемокинов. Классическая активация макрофагов LPS приводит к экспрессии генов провоспалительных хемокинов (CXCL8, CXCL9, CCL2, CCL3). При альтернативной активации IL-4 и IL-13 селективно индуцируют синтез CCL17, CCL22 и CCL24, а IL-10 – CCL16 и CCL18 [3]. S. Gordon (2003) показал, что функциональная активность M1-клеток опосредуется через продукцию хемокинов, являющихся хемоаттрактантами для Th1-лимфоцитов (например, CXCL9 или CXCL10), в то время как M2-макрофаги секретируют CCL18 и CCL22 – хемокины, проявляющие хемотаксические свойства в отношении Th2-лимфоцитов и регуляторных Т-клеток [10]. Функциональный фенотип макрофагов определяет не только спектр продуцируемых ими хемокинов, но и экспрессию хемокиновых рецепторов на клетках. Так, на M1-макрофагах преобладает экспрессия CCR7. M2-макрофаги, активированные IL-4, характеризуются высокой экспрессией CXCR1 и CXCR2, в то время как клетки M2, активированные IL-10, несут на своей поверхности CCR2 и CCR5 [3, 35].

Таким образом, макрофаги различных субпопуляций обладают разнонаправленными эффектами. С одной стороны, они участвуют в процессах, связанных с деструкцией тканей в очаге воспаления при выполнении эффекторной функции, с другой – выполняя регенераторную функцию, участвуют в процессах заживления.

МАКРОФАГИ ЛЕГКИХ И ИХ ЗАЩИТНАЯ ФУНКЦИЯ

Легочная система макрофагов состоит из нескольких субпопуляций, которые находятся в разных анатомических отделах легких, включая дыхательные пути, альвеолярные пространства и резидентную легочную ткань. Альвеолярные макрофаги составляют более 90% популяции легочных макрофагов. Традиционно их источником считаются клетки-предшественницы костного мозга. АМ имеют своеобразный фенотип, проявляют низкий уровень экспрессии фагоцитарного рецептора CD11b, но высокий уровень экспрессии интегрина CD11c и лектина SiglecF, что позволяет различать их среди других миелоидных клеток ткани легкого. M. Williams с соавт. (2013)

на мышинной модели установили, что АМ образуются из моноцитов крови плода под влиянием колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), но в период постнатального развития поддержание популяции АМ во многом зависит от их способности к самообновлению [36]. Следовательно, в целом популяция макрофагов легких в основном поддерживается самообновлением легочных АМ путем локальной пролиферации. Такая пролиферация является гомеостатической и активируется во всех случаях дефицита иммунокомпетентных клеток. Местная пролиферация АМ при гомеостатическом истощении их резерва зависит как от GM-CSF, так и от M-CSF (колониестимулирующего фактора макрофагов), но при этом не зависит от сигналов, генерируемых действием IL-4 [37]. Таким образом, GM-CSF и M-CSF одновременно контролируют пролиферацию и дальнейшее выживание АМ. Наряду с этим дифференцировка АМ и их основные функции, включая фагоцитоз и катаболизм поверхностно-активных веществ, контролируются преимущественно GM-CSF [38].

АМ экспрессируют три класса рецепторов для Fc-фрагмента антител класса IgG: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16) [39]. Первые два из этих рецепторов экспрессируют также моноциты крови, третий же является особенностью АМ. Между моноцитами и АМ имеется различие и по экспрессии рецепторов для белков системы комплемента (CR). Так, на АМ усилена экспрессия CR4 при ослабленной экспрессии CR3 и CR1. АМ отличаются от моноцитов крови сниженной экспрессией адгезивных молекул LFA1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) и отсутствием на мембране белков семейства интегринов. Однако по уровню экспрессии антигенов гистосовместимости МНС АМ не уступают моноцитам крови. АМ координируют противомикробную защиту посредством экспрессии scavenger-рецепторов, комплемента, β-гликана, маннозы, которые облегчают фагоцитарную функцию АМ, генерируют активные формы азота и кислорода, участвующие в защите от микробной инфекции [40]. АМ являются центральными регуляторами редукции воспаления, благодаря их способности поглощать апоптотические клетки в ходе эффекторной фазы иммунного ответа в легких [41].

РОЛЬ МАКРОФАГОВ В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХ

Особое место среди заболеваний органов дыхания занимают туберкулез легких, острая пневмония, хронические неспецифические бо-

лезни легких, особенно хронический бронхит, хроническая обструктивная болезнь легких. Слизистая оболочка респираторного тракта – обширная поверхность для внедрения в организм человека болезнетворных микроорганизмов и токсичных веществ. Ранний иммунный ответ на бактериальные инфекции запускает активацию экспрессии генов, участвующих в поляризации созревания M1-макрофагов. К ним относятся гены, кодирующие цитокины, такие как IL-15, хемокины (CCL2, CCL5 и CXCL8) и хемокиновый рецептор CCR7. Другие M1-связанные гены кодируют ферменты индоламин-2,3 диоксигеназу (IDO) и NO-синтазу 2 (NOS2), которые участвуют в микробицидной активности макрофагов, и костимулирующие молекулы группы B7 – CD80 и CD86. Вероятно, M1-активация необходима как общий «сигнал тревоги» против бактерий, индуцирующих активность макрофагов, поскольку большинство генов провоспалительных цитокинов экспрессируются независимо от вида бактерий. Поляризация макрофагов в направлении M1 обычно связана с включением защитной функции иммунной системы при острых инфекционных заболеваниях. Например, *Listeria monocytogenes*, которая вызывает заболевание у пациентов с ослабленным иммунитетом и беременных женщин, индуцирует программу активации M1-клеток, что способствует образованию бактериальной фагосомы и стимулирует внутриклеточное уничтожение бактерий *in vitro* и *in vivo* [42].

Хроническое течение инфекционных заболеваний легких связано с перепрограммированием макрофагов в направлении профиля M2. Один из примеров, подтверждающих такую дифференцировку макрофагов, был продемонстрирован А. Joshi и Т. Raymond (2008). По данным авторов, в результате заражения *Schistosoma mansoni* у мышей развивался легочный фиброз, что свидетельствует об участии M2-клеток в патогенезе патологического процесса. У мышей с легочным гранулематозом, инфицированных *Schistosoma mansoni*, макрофаги, полученные из костного мозга, экспрессировали больше CCL18 и MSR CD36 (маркеры макрофагов с фенотипом M2) и меньше iNOS, CCL3, MIP-2, TNFα и IL-12 (маркеры клеток с фенотипом M1). Авторами показано, что по сравнению с наивными M0-макрофагами макрофаги, дифференцированные в условиях Th2-зависимого иммунного ответа при инфекции *Schistosoma mansoni*, проявляют повышенную реактивность на присутствие специфических агонистов TLR, активирующих экспрессию генов цитокинов как M1-, так и M2-макрофагов [43].

При идиопатическом легочном фиброзе в альвеолярной ткани определяются преимущественно цитокины Th2-профиля, которые способствуют пролиферации, дифференцировке и секреторной активности фибробластов, эпителиальных клеток, Т-клеток и макрофагов. У человека и мышей на фоне этой патологии, по данным иммуногистохимических исследований, среди клеток бронхоальвеолярного лаважа преобладают макрофаги с фенотипом M2. Однако на экспериментальной модели фиброза при развитии силикоза у мышей показано отсутствие преимущественной поляризации созревания макрофагов по какому-либо фенотипу, также как и отсутствие поляризации дифференцировки Т-клеток в направлении Th1 или Th2 [44].

Хронический бруцеллез характеризуется поражением всех органов и систем человека, при этом в патологический процесс вовлекаются дыхательные пути. После заражения мышей *Brucella abortus* D. Fernandes и J. Jiang (1996) обнаружили, что хронический бруцеллез связан с опосредованной IL-10 M2-поляризацией макрофагов. В ходе эксперимента показано, что нейтрализация IL-10 и IL-4 рекомбинантными антагонистами у инфицированных мышей способствовала уничтожению *Brucella abortus* макрофагами за счет активации продукции IFN γ и конверсии макрофагов в M1-клетки [45].

Фенотип макрофагов в очаге воспаления не всегда соответствует их классификации по функциональной активности. Различные виды стрептококков могут вызывать менингит, пневмонию, эндокардит и некротизирующий фасциит у людей и животных. При первичном инфицировании бактериями семейства стрептококков обычно развивается острая воспалительная реакция с преобладанием TLR2-зависимого пути активации врожденного иммунитета с участием M1-макрофагов [46]. Человеческие и мышинные макрофаги различаются по своим реакциям на *Streptococcus pyogenes*. У людей этот возбудитель индуцирует M1-клетки, характеризующиеся повышенной экспрессией мРНК хемокинов CCL2, CCL5, CXCL8 и CXCL10 [47]. У мышей *Streptococcus pyogenes* стимулирует необычную программу активации, которая объединяет профили M1 и M2 дифференцировки макрофагов [48].

Пневмония, вызванная *Streptococcus pneumoniae*, – инфекционное заболевание легких с высокой летальностью, особенно среди младенцев и пожилых людей. На его долю приходится 1,6 млн смертельных исходов во всем мире (из них 1 млн – среди детей), преимущественно в развивающихся странах [49].

Streptococcus pneumoniae – основной возбудитель внебольничной пневмонии, менингита, среднего отита, синусита. В редких случаях пневмококк может вызывать инфекции другой локализации (эндокардит, септический артрит, первичный перитонит, флегмоны и др.) [50]. А. Kadioglu и соавт. (2004) были рассмотрены механизмы иммунной защиты от пневмококков при их проникновении в АМ, включающие активацию нескольких факторов: гомеостатическую пролиферацию альвеолярных макрофагов (M1 и M2), инфильтрацию очага воспаления нейтрофилами, активацию системы комплемента и CD4+ Т-клеток с развитием воспалительного адаптивного иммунного ответа [51].

Т. Menter и соавт. (2014) было проведено исследование причин повышенной восприимчивости к *Streptococcus pneumoniae* и смертности от пневмонии в зависимости от возраста пациентов. В результате оценки состава клеток в очаге воспаления (нейтрофильных гранулоцитов и различных субпопуляций лимфоцитов и макрофагов) методом иммуногистохимического анализа на образцах легочной ткани у молодых пациентов, больных среднего возраста и пожилых людей со стрептококковой пневмонией выявлено более высокое содержание нейтрофильных гранулоцитов у пожилых людей. Напротив, у молодых и пациентов среднего возраста, по сравнению с пожилыми пациентами, обнаружено большее содержание АМ с фенотипом CD11c+ и M1-макрофагов (CD14+HLA-DR+). При этом не установлено существенной разницы в отношении количества M2-макрофагов и лимфоцитов [52]. Было сделано предположение, что программа активации макрофагов с фенотипом M1 у более молодых пациентов связана с эффективной защитной функцией иммунной системы при развитии стрептококковой пневмонии. Однако чрезмерная или продолжительная M1-активация может иметь негативный характер, усиливая повреждающие эффекты воспаления.

МАКРОФАГИ И МИКОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ИНФЕКЦИЯ. МЕХАНИЗМЫ УСКОЛЬЗАНИЯ *Mycobacterium tuberculosis* ОТ ФАГОЦИТОЗА

Активный туберкулез может возникать непосредственно после инфицирования или за счет реактивации латентной инфекции, которая ограничена гранулемами. Дальнейшее развитие и поддержание воспаления внутри гранулемы зависят от эффективности специфического проти-

вотуберкулезного иммунного ответа, механизмы которого окончательно не раскрыты. У иммунокомпрометированных пациентов инфицирование *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) может привести к развитию остро прогрессирующих форм туберкулеза легких.

Существует гипотеза, что микобактерии модулируют активацию М2-макрофагов, чтобы эффективно использовать гранулему как источник своего существования [53, 54].

Кроме того, *Mtb* в случае презентации антигена DC взаимодействуют с последними через рецептор DC-SIGN (CD209), подавляя передачу TLR2-зависимого сигнала. Показано, что взаимодействие лиганда с TLR2 опосредует процесс созревания, активации DC и запуск иммунного ответа, что характерно для иммуногенных DC, активация же CD209-зависимой сигнальной трансдукции, напротив, способствует формированию толерогенных DC и, как следствие, нарушению экспрессии костимулирующих молекул [55]. L. Balboa и соавт. (2013) обнаружили, что CD16-негативные моноциты дифференцируются в DC с фенотипом CD1a+DC-SIGN^{high}, обеспечивая эффективный ответ на *Mtb*, а CD16-позитивные моноциты – в DC с фенотипом CD1a-DC-SIGN^{low}, характеризующиеся слабой презентацией микобактериальных антигенов. При этом у больных туберкулезом легких отмечалось увеличение количества CD16-позитивных клеток до 40% от общего числа моноцитов в крови. Снижение численности CD16+ клеток ассоциировалось с дифференцировкой моноцитов в CD1a+DC-SIGN^{high} дендритные клетки [56].

М. Benoit с соавт. (2008) на нескольких мышиных моделях показано, что в раннюю фазу иммунного ответа против *Mtb* доминирует М1-поляризация макрофагов и по течению она напоминает клиническую картину, развивающуюся у пациентов с активным туберкулезом легких [57]. Выявлено, что у мышей в структуре гранулемы макрофаги с фенотипом М1 преобладают между 7-м и 30-м днями после экспозиции *Mtb*-антигена, при этом в гранулеме обнаруживается высокий уровень IFN γ и iNOS [58]. В целом дифференцировка макрофагов в направлении М1 является частью «общей реакции хозяина» против внутриклеточных бактерий и характеризуется высокой экспрессией М1-клетками iNOS с последующим образованием оксида азота (NO), секрецией провоспалительных цитокинов и хемокинов, высвобождением протеолитических ферментов и антимикробных пептидов, усилением фагоцитоза

и развитием токсичной для *Mtb* внутриклеточной среды [59]. Учитывая эту враждебную среду, созданную М1-макрофагами, неудивительно, что *Mtb* разработали стратегии, препятствующие М1-поляризации.

Исследованы некоторые механизмы ускользания *Mtb* от повреждающего действия клеток врожденного иммунитета. Так, В. Miller и соавт. (2004) выявили, что некоторые виды *Mtb* способны нейтрализовать эффекторные молекулы М1-макрофагов. Например, *Mycobacterium bovis* *bacillus Calmette-Guerin* препятствует поступлению NOS2 в фагосомы и ингибируют высвобождение NO [60]. На поздних стадиях инфекции количество альтернативно активированных макрофагов увеличивается, что приводит к нарушению продукции NO и способствует выживанию *Mtb* [61]. Кроме того, обнаружено, что вирулентность *Mtb* в значительной степени определяется наличием у возбудителя кластера генов *ESX-3*, экспрессия которых приводит к подавлению созревания фагосом [62]. Микобактерии блокируют активацию М1-макрофагов через секрецию факторов вирулентности. Это было продемонстрировано на выделенном антигене ESAT-6 из *Mtb*, который ингибирует активацию фактора транскрипции NF- κ B и IRF (интерферон-регулирующие факторы) через TLR2-зависимые механизмы [63]. В результате макрофаги становятся неспособными разрушать высоковирулентные штаммы *Mtb*, при этом *Mtb* может ингибировать транскрипцию генов *IFN* с привлечением IL-6 [64]. Несмотря на то, что IL-6 связывают с М1-активацией, он может принимать участие и в ограничительных реакциях иммунного ответа [65].

В процессе клеточно-опосредованного иммунного ответа на *Mtb* синтезируется IFN γ , который активирует макрофаги и другие клетки противотуберкулезной защиты – гранулоциты, натуральные киллеры. Для киллинга *Mtb* в цитозоле макрофага под влиянием IFN γ формируется аутофаголизосома, и возбудитель разрушается в ней ферментами лизосомных гранул. Вместе с тем *Mtb* обладают свойством блокировать фагосомно-лизосомное слияние. Так, в ответ на активацию TLR и синтез макрофагами IL-1 β включается механизм аутофагии. IL-1 β восстанавливает нарушенный микобактериями процесс созревания фагосомы путем возобновления продукции PI(3)P (фосфатидилинозитол-3-фосфата) – важного участника TLR2-зависимого сигнального пути. В ответ *Mtb* секретирует цинкметаллопротеазу *ZmpA*, которая ингибирует продукцию IL-1 β

макрофагами, что подавляет синтез PI(3)P и вновь замедляет созревание фагосом. Таким образом, вероятность внутриклеточного выживания бактерий остается высокой и определяется исходом длительного противостояния патогена и организма хозяина [62].

Mtb перепрограммируют M1-макрофаги в M2-клетки путем секреции иммуносупрессорного медиатора IL-10. Обнаружено, что *Mtb* могут влиять на все сигналы, зависящие от TLR, и ограничивать провоспалительный ответ путем направленной индукции секреции IL-10 через рецептор CD209 на DC [66, 67]. Показано, что M2-макрофаги человека, генерированные в присутствии M-CSF, характеризуются высокой секрецией IL-10 на фоне дефицита продукции IL-12, IL-1 β , IL-6 и TNF α в ответ на стимуляцию LPS, микобактериальными антигенами, зимозаном A или IFN γ в комбинации с CD40L [68].

В целом AM характеризуются низкой фагоцитарной активностью и способностью ингибировать активацию Т-клеток. Толерогенные свойства AM определяются эффектами TGF β , который образуется альвеолярными эпителиальными клетками и подавляет фагоцитарную, антигенпрезентирующую и провоспалительную активность AM [69]. Ранее предполагалось, что макрофаги теряют рецептор к TGF β в процессе дифференцировки [70, 71]. Однако выявленные изменения экспрессии мРНК рецептора к IL17BR в макрофагах при действии TGF β позволили предположить, что в определенных условиях макрофаги сохраняют способность отвечать на TGF β [72].

Способность макрофагов подвергаться супрессорному влиянию TGF β имеет важное значение в патогенезе развития и генерализации туберкулезной инфекции. Так, ранее нами были установлены молекулярные механизмы иммуносупрессии при туберкулезе легких, связанные с антиген-зависимой генерацией и активацией регуляторных Т-клеток, генетически детерминированной гиперпродукцией ингибиторных цитокинов – TGF β и IL-10 [73, 74].

Отмечено участие scavenger-рецепторов клеток врожденного иммунитета в регуляции адаптивного иммунного ответа при туберкулезе легких путем направленной дифференцировки Т-хелперов после распознавания ими антигенного пептида. Так, Zhipeng Xu и соавт. (2017) на мышинной модели туберкулезной инфекции показали, что экспрессия PRR (паттерн-распознающего рецептора) класса A (CD204) регулируется патогеном и подавляет транслокацию в ядро IRF-5, сдвигая поляризацию макрофагов от M1 к M2, и тем са-

мым переключает адаптивный ответ Т-хелперов с Th1-пути на Th2-путь [30].

Таким образом, с одной стороны, при туберкулезе легких макрофаги находятся в микроокружении, содержащем комбинацию противовоспалительных и супрессорных цитокинов, которые могут способствовать их дифференцировке в M2-клетки с соответствующим функциональным фенотипом. С другой стороны, *Mtb* обладают свойствами, подавляющими M1-поляризацию макрофагов. Экспрессия scavenger-рецепторов на M2-макрофагах оказывает модулирующее влияние на дифференцировку Т-лимфоцитов, способствует диссеминации *Mtb* (при развитии Th2-иммунного ответа) и патологическому ремоделированию легочной ткани, ее фиброзу (при развитии Treg-иммунного ответа) [30, 75, 76].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из важнейших нерешенных проблем патофизиологии инфекционного процесса является оценка особенностей воспаления – универсальной реакции врожденного иммунитета, которая развивается в ткани легких в ответ на проникновение патогена в альвеолярные макрофаги. Во многом открытыми остаются вопросы, связанные с механизмами, определяющими экспрессию генов молекулярных факторов, направление дифференцировки, активацию и функциональную пластичность макрофагов при развитии инфекционных заболеваний легких. Активно исследуются механизмы контактного взаимодействия между миелоидными и лимфоидными клетками врожденного иммунитета. Современные методы лечения заболеваний органов дыхательной системы не всегда способствуют достижению нужного терапевтического эффекта. Глобальной проблемой XXI в. становится возрастающая лекарственная резистентность бактерий к антибиотикам, поэтому применение альтернативных антибактериальной терапии методов лечения приобретает все большую востребованность в клинической практике. Поскольку макрофаги обладают высокой степенью фенотипической гетерогенности и функциональной пластичностью, они являются оптимальной мишенью для разработки новых методов клеточной иммунотерапии. Учитывая особенности иммунопатогенеза инфекционных заболеваний легких, актуальным и перспективным направлением для решения обозначенных вопросов представляется принудительное перепрограммирование фенотипа макрофагов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Swirski F.K., Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*. 2013; 339 (6116): 161–166. DOI: 10.1126/science.1230719.
- Possamai L.A., Thursz M.R., Wendon J.A., Antoniadou C.G. Modulation of monocyte/macrophage function: a therapeutic strategy in the treatment of acute liver failure. *J. Hepatol.* 2014; 61 (2): 439–445. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.03.031.
- Hume D.A., Ross I.L., Himes S.R., Sasmono R.T., Wells C.A., Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 72 (4): 621–627.
- Tsou C.L., Peters W., Si Y., Slaymaker S., Aslanian A.M., Weisberg S.P., Mack M., Charo I.F. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* 2007; 117 (4): 902–909. DOI: 10.1172/JCI29919.
- Varol C., Mildner A., Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annual Review of Immunology*. 2015; 33: 643–675. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220.
- Schulz C. et al. A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. *Science*. 2012; 336: 86–90. DOI: 10.1126/science.1219179.
- Монастырская Е.А., Лямина С.В., Малышев И.Ю. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии. *Патогенез*. 2008; 6 (4): 31–39. [Monastyrskaya E.A., Lyamina S.V., Malyshev I.Yu. M1 and M2 phenotypes of activated macrophages and their role in the immune response and pathology. *Pathogenesis*. 2008; 6 (4): 31–39 (in Russ.)].
- Lang R., Patel D., Morris J.J., Rutschman R.L., Murray P.J. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J. Immunol.* 2002; 169 (5): 2253–2263.
- Martinez F.O., Gordon S., Locati M., Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte to Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J. Immunol.* 2006; 177: 7303–7311.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3 (1): 23–35.
- Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., Fisher E.A., Gilroy D.W., Goerdt S., Gordon S., Hamilton J.A., Ivashkiv L.B., Lawrence T. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014; 41 (1): 14–20. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
- Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: Their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007; 81 (3): 584–592.
- Shahid F., Lip G., Shantsila E. Role of Monocytes in heart failure and atrial fibrillation. *J. Am. Heart. Assoc.* 2018; 7 (3). DOI: 10.1161/JAHA.117.007849.
- Cassetta L., Cassol E., Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *Sci. World J.* 2011; 11: 2391–2402. DOI: 10.1100/2011/213962.
- Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and re-modeling. *J. Pathol.* 2013; 229 (2): 176–185.
- Schutysse E., Richmond A., van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 78 (1): 14–26.
- Di Rosa M., Malaguarnera G., De Gregorio C., D'Amico F., Mazzarino M.C., Malaguarnera L. Modulation of chitotriosidase during macrophage differentiation. *Cell Biochem. Biophys.* 2013; 66 (2): 239–247. DOI: 10.1007/s12013-012-9471-x.
- Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013; 496 (7446): 445–455. DOI: 10.1038/nature12034.
- Kapellos T.S., Iqbal A.J. Epigenetic Control of Macrophage Polarisation and Soluble Mediator Gene Expression during Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2016; 6591703. DOI: 10.1155/2016/6591703. Epub 2016 Apr 10.
- Ginhoux F., Williams M., Naik S.H. Editorial: Dendritic Cell and Macrophage Nomenclature and Classification. *Front. Immunol.* 2016; 7: 168. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00168.
- Hoeffel G., Ginhoux F. Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Immunol.* 2015; 6: 486. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00486.
- Hussell T., Bell T. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Immunol.* 2014; 14 (2): 81–93. DOI: 10.1038/nri3600.
- Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 2008; 1 (13): 453–461.
- Kreider T., Anthony R.M., Urban Jr. J.F., Gause W.C. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr. Opin. Immunol.* 2007; 19 (4): 448–453.
- Schenk M., Fabri M., Krutzik S.R., Lee D.J., Vu D.M., Sieling P.A., Montoya D., Liu P.T., Modlin R.L. Interleukin-1 β triggers the differentiation of macrophages with enhanced capacity to present mycobacterial antigen to T cells. *Immunology*. 2014 Feb; 141 (2): 174–180. DOI: 10.1111/imm.12167.
- Сахно Л.В., Шевела Е.Я., Черных Е.Р. Фенотипические и функциональные особенности альтернативно активированных макрофагов: возможное использование в регенеративной медицине. *Иммунология*. 2015; (4): 60–64. [Sakhno L.V., Shevela E.Ya., Chernykh E.R. Phenotypic and functional features of an alternatively activated macrophages: possible use in regenerative medicine. *Immunology*. 2015; (4): 60–64 (in Russ.)].
- Schenk M., Fabri M., Krutzik S.R., Lee D.J., Vu D.M., Sieling P.A., Montoya D., Liu P.T., Modlin R.L. Interleukin-1 β triggers the differentiation of macrophages with enhanced capacity to present mycobacterial antigen to T cells. *Immunology*. 2014; 141 (2): 174–180. DOI: 10.1111/imm.12167.

28. Gordon S., Martinez F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010; 32 (5): 593–604. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.
29. Maler M.D., Nielsen P.J., Stichling N., Cohen I., Ruzsics Z., Wood C., Engelhard P., Suomalainen M., Gyory I., Hube M., Müller-Quernheim J., Schamel W.A., Gordon S., Jakob T., Martin S.F., Jahnen-Dechent W., Greber U.F., Freudenberg M.A., Fejer G. Key role of the scavenger receptor MARCO in mediating adenovirus infection and subsequent innate responses of macrophages. *MBio*. 2017; Jul. Aug. 8 (4): e00670–17. Published online 2017 Aug 1. DOI: 10.1128/mBio.00670-17.
30. Xu Z., Xu L., Li W., Jin X., Song X., Chen X., Zhu J., Zhou S., Li Y., Zhang W., Dong X., Yang X., Liu F., Bai H., Chen Q., Su C. Innate scavenger receptor-A regulates adaptive T helper cell responses to pathogen infection. *Nat. Commun.* 2017; 8: 16035. DOI: 10.1038/ncomms16035.
31. PrabhuDas M.R., Baldwin C.L., Bollyky P.L., Bowdish D.M.E., Drickamer K., Febbraio M., Herz J., Kobzik L., Krieger M., Loike J., McVicker B., Means T.K., Moestrup S.K., Post S.R., Sawamura T., Silverstein S., Speth R.C., Telfer J.C., Thiele G.M., Wang X.Y., Wright S.D., El Khoury J.A. Consensus definitive classification of scavenger receptors and their roles in health and disease. *J. Immunol.* 2017; May 15; 198 (10): 3775–3789. DOI:10.4049/jimmunol.1700373.
32. Wong C.K., Smith C.A., Sakamoto K., Kaminski N., Koff J.L., Goldstein D.R. Aging impairs alveolar macrophage phagocytosis and increases influenza-induced mortality in mice. *J. Immunol.* 2017; Aug 1; 199 (3): 1060–1068. DOI: 10.4049/jimmunol.1700397. Epub 2017 Jun 23.
33. Давлятшина Н.З., Маянская А.Р., Мухаметгалиева Е.В., Майкова О.А., Кравцова Н.Е. Особенности экспрессии генов сквенджер-рецепторов моноцитов и макрофагов при разных клинических формах атеросклероза. *Вестник современной клинической медицины*. 2017; 10 (2): 13–18. [Davlyatshina N.Z., Mayanskaya A.R., Mukhametgalieva E.V., Maykova O.A., Kravtsova N.E. Features of gene expression of scavenger receptors of monocytes and macrophages in various clinical forms of atherosclerosis. *Bulletin of Modern Clinical Medicine*. 2017; 10 (2): 13–18 (in Russ.)].
34. Alidori S., Akhavein N., Thorek D.L., Behling K., Romin Y., Queen D., Beattie B.J., Manova-Todorova K., Bergkvist M., Scheinberg D.A., McDevitt M.R. Targeted fibrillar nanocarbon RNAi treatment of acute kidney injury. *Sci. Transl. Med.* 2016; 8 (331): 331–339. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac9647.
35. Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. The immune system in health and disease. *Immunobiology*. Garland Science Publishing. 2005; 37–95.
36. Guillems M., De Kleer I., Henri S., Post S., Vanhoutte L., De Prijck S., Deswarte K., Malissen B., Hammad H., Lambrecht B.N. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* 2013; 210 (10): 1977–1992. DOI:10.1084/jem.20131199.
37. Hashimoto D., Chow A., Noizat C., Teo P., Beasley M.B., Leboeuf M., Becker C.D., See P., Price J., Lucas D., Greter M., Mortha A., Boyer S.W., Forsberg E.C., Tanaka M., Rooijen N., Garbajosa-Sastre A., Stanley E.R., Ginhoux F., Frenette P.S., Merad M. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013; 38 (4): 792–804. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.04.004.
38. Shibata Y., Berclaz P.Y., Chroneos Z.C., Yoshida M., Whitsett J.A., Trapnell B.C. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity*. 2001; 15 (4): 557–567. DOI: 10.1016/S1074-7613(01)00218.
39. Пинегин Б.В., Карсонова М.И. Макрофаги: свойства и функции. *Иммунология*. 2009; 4: 241–249. [Pinegin B.V., Karsonova M.I. Macrophages: properties and functions. *Immunology*. 2009; 4: 241–249 (in Russ.)].
40. Taylor P.R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H.H., Brown G.D., Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 901–944.
41. Knapp S., Leemans J.C., Florquin S., Branger J., Maris N.A., Pater J., Rooijen N., Poll T. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167 (2): 171–179. DOI: 10.1164/rccm.200207-698OC.
42. Shaughnessy L. M., Swanson J. A. The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. *Front. Biosci.* 2007; 12: 2683–2692.
43. Joshi A.D., Raymond T., Coelho A.L., Kunkel S.L., Hoga-boam C.M. A systemic granulomatous response to *Schistosoma mansoni* eggs alters responsiveness of bone-marrow-derived macrophages to Toll-like receptor agonists. *J. Leukoc. Biol.* 2008; 83 (2): 314–324.
44. Misson P., van den Brule S., Barbarin V., Lison D., Haux F. Markers of macrophage differentiation in experimental silicosis. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 76: 926–932.
45. Fernandes D.M., Jiang X., Jung J.H., Baldwin C.L. Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996; 16 (3-4): 193–203.
46. Kadioglu A., Andrew P.W. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends Immunol.* 2004; 25 (3): 143–149.
47. Veckman V., Miettinen M., Matikainen S., Lande R., Gacomini E., Coccia M., and Julkunen I. Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. *J. Leukocyte Biol.* 2003; 74 (3): 395–402.
48. Goldmann, O., von Kockritz-Blickwede M., Holtje C., Chhatwal G.S., Geffers R., Medina E. Transcriptome analysis of murine macrophages in response to infection

- with *Streptococcus pyogenes* reveals an unusual activation program. *Infect. Immun.* 2007; 75 (8): 4148–4157.
49. WHO pneumonia fact sheet. WHO; Geneva, Switzerland, 2016. World Health Organization Report, 2016.
 50. Кречикова О.И., Козлов Р.С., Катосова Л.К., Вишнякова Л.А., Фаусова М.Е. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae*. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000; 2 (1): 88. [Krechikova O.I., Kozlov R.S., Katosova L.K., Vishnyakova L.A., Faustova M.E. Isolation, identification, and determination of *Streptococcus pneumoniae* antibiotics. *Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy*. 2000; 2 (1): 88 (in Russ.)].
 51. Kadioglu A., Coward W., Colston M.J., Colin R., Hewitt A., Andrew P.W. CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect. Immun.* 2004 May; 72 (5): 2689–2697. DOI: 10.1128/IAI.72.5.2689-2697.2004.
 52. Menter T., Giefing-Kroell C., Grubeck-Loebenstien B., Tzankov A. *Pathobiology*. 2014; 81 (3): 160–167. DOI: 10.1159/000360165. Epub 2014 Apr 15.
 53. Davis J., Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*. 2009; 136 (1): 37–49. DOI: 10.1016/j.cell.2008.11.014
 54. Volkman H., Pozos T., Zheng J., Davis J., Rawls J. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science*. 2010; 327 (5964): 466–469. DOI: 10.1126/science.1179663. Epub 2009 Dec 10.
 55. Urazova O., Smolyagina R., Churina E., Novitskiy V. The factors of dendritic cells dysfunction at pulmonary tuberculosis. *Pathophysiology*. 2018; 25 (3): 230. DOI: 10.1016/j.pathophys.2018.07.150.
 56. Balboa L., Romero M.M., Laborde E., Sabio Y., Garsna C.A., Basile J.I., Schierloh P., Yokobori N., Musella R.M., Castagnino J., de la Barrera S., Sasiain M.C., Alemón M. Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: role of p38 MAPK. *Eur J. Immunol.* 2013; 43 (2): 335–347. DOI: 10.1002/eji.201242557.
 57. Benoit M., Desnues B., Mege J.L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.* 2008; 181 (6): 3733–3739.
 58. Redente E.F., Higgins D.M., Dwyer-Nield L.D., Orme I.M., Gonzalez-Juarrero M., Malkinson A.M. Differential polarization of alveolar macrophages and bone marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 88 (1): 159–168. DOI: 10.1189/jlb.0609378. Epub 2010 Apr Redente et al., 2010.
 59. Murray P., Wynn T. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11 (11): 723–737. DOI: 10.1038/nri3073.
 60. Miller B.H., Fratti R.A., Poschet J.F., Timmins G.S., Master S.S., Burgos M., Marletta M.A., Deretic V. Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infect. Immun.* 2004; 72 (5): 2872–2878.
 61. Kahnert A., Seiler P., Stein M., Bandermann S., Hahnke K., Mollenkopf H. Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36 (3): 631–647.
 62. Гариб Ф.Ю., Ризопулу А.П. Взаимодействие патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина. *Инфекция и иммунитет*. 2012; 2 (3): 581–596. [Garib F.Yu., Rizopulu A.P. The interaction of pathogenic bacteria with innate host immune responses. *Infection and Immunity*. 2012; 2 (3): 581–596 (in Russ.)].
 63. Pathak S.K., Basu S., Basu K.K., Banerjee A., Pathak S., Bhattacharyya A., Kaisho T., Kundu M., and Basu J. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat. Immunol.* 2007; 8(6): 610–618.
 64. Ting L.M., Kim A.C., Cattamanchi A., Ernst J.D. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN- transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J. Immunol.* 1999; 163 (7): 3898–3906.
 65. Nagabhushanam V., Solache A., Ting L.M., Escaron C.J., Zhang J.Y., Ernst J.D. Innate inhibition of adaptive immunity: *Mycobacterium tuberculosis*-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN-gamma. *J. Immunol.* 2003; 171 (9): 4750–4757.
 66. Geijtenbeek T.B., van Vliet S.J., Koppel E.A., Sanchez-Hernandez M., Vandenbroucke-Grauls C.M., Appelmelk B., van Kooyk Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J. Ex. Med.* 2003; Jan. 6; 197 (1): 7–17.
 67. Hajishengallis G., Lambris J. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11 (3): 187–200. DOI: 10.1038/nri2918.
 68. Verreck F.A.W., de Boer T., Langenberg D.M.L., van der Zanden L., Ottenhoff T.H.M. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN γ and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 79 (2): 285–293.
 69. Li M.O., Wan Y.Y., Sanjabi S., Robertson A.K., Flavell R.A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Ann. Rev. Immunol.* 2006; 24: 99–146.
 70. Brandes M.E., Wakefield L.M., Wahl S.M. Modulation of monocyte type I transforming growth factor-beta receptors by inflammatory stimuli. *J. Biol.Chem.* 1991; 266 (29): 19697–19703.
 71. Ashcroft G.S. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes Infect.* 1999; 1 (15): 1275–1282.

72. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Duperrier K., Utikal J., Velten F.W., Goerd S. The receptor for interleukin-17E is induced by Th2 cytokines in antigen-presenting cells. *Scand. J. Immunol.* 2004; 60 (3): 233–237.
73. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V. The role of foxp3-expressing regulatory T cells and T helpers in immunopathogenesis of multidrug resistant pulmonary tuberculosis. *Tuberc. Res. Treat.* 2012; 2012: 931291. DOI: 10.1155/2012/931291.
74. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В. Регуляторные Т-клетки и противотуберкулезный иммунитет. Томск: Печатная мануфактура, 2014: 156. [Churina E.G., Urazova O.I., Novitskii V.V. Regulatory T-cells and anti-tuberculosis Immunity. Tomsk: Printing Company Publ., 2014: 156 (in Russ.)].
75. Noy R., Pollard J.W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity.* 2014; 41 (1): 49–61. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.010.
76. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Есимова И.Е., Кононова Т.Е., Филинчук О.В., Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И. Факторы дисрегуляции иммунного ответа (на различных этапах его реализации) при туберкулезе легких. *Бюллетень сибирской медицины.* 2016; 15 (5): 166–177. [Churina E.G., Urazova O.I., Novitskii V.V., Yesimova I.Y., Kononova T.Y., Filinyuk O.V., Kolobovnikova Y.V., Dmitrieva A.I. The factors of dysregulation of the immune response (at different stages of its implementation) in patients with pulmonary tuberculosis. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2016; 15 (5): 166–177 (in Russ.)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-5-166-177.

Сведения об авторах

Чурина Елена Георгиевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра органической химии, НИ ТГУ; вед. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-8509-9921.

Ситникова Анжелика Владимировна, аспирант, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, ТУСУР, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9457-8879.

Чумакова Светлана Петровна, д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-3468-6154.

Винс Мария Васильевна, аспирант, ассистент, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

Береснева Алина Евгеньевна, студент, медико-биологический факультет, СибГМУ, г. Томск.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, кафедра патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, ТУСУР, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9577-8370.

✉ **Чурина Елена Георгиевна**, e-mail: Lena1236@yandex.ru.

Authors information

Churina Elena G., DM, Professor, Pathophysiology Division, SSMU; Professor, Organic Chemistry Department, NR TSU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8509-9921.

Sitnikova Anzhelika V., Post-graduate Student, Pathophysiology Division, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Urazova Olga I., DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Pathophysiology Division, SSMU; Professor, Department of Complex Information Security of Computer Systems, TUSUR, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9457-8879.

Chumakova Svetlana P., DM, Professor, Pathophysiology Division, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3468-6154.

Vins Maria V., Post-graduate Student, Assistant, Pathophysiology Division, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Beresneva Alina E., Student, Medical and Biological Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Novitskiy Vyacheslav V., DM, Professor, Academician of RAS, Honored Scientist of Russia, Professor of the Pathophysiology Division, SSMU; Professor, Department of Complex Information Security of Computer Systems, TUSUR, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9577-8370.

✉ **Churina Elena G.**, e-mail: Lena1236@yandex.ru.

Received 01.12.2018
Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 01.12.2018
Подписана в печать 17.12.2018

УДК 616-008.853.2-091.818-092.4:576.5
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-155-163>

Индукция апоптоза лимфоцитов здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом в условиях «клеточного соседства» *in vitro*

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

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

² Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)
Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

РЕЗЮМЕ

Целью данной работы являлось изучение особенностей апоптоза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного соседства» *in vitro* у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовались образцы крови пациенток с ревматоидным артритом (РА) и здоровых женщин сопоставимого возраста. Нами был разработан протокол, позволивший дифференцированно оценить в «первично» (CFSE⁻) и «вторично» (CFSE⁺) индуцированных в апоптоз культурах Т-лимфоцитов параметры пролиферации, раннего, позднего апоптоза и некроза.

Результаты. Был установлен характер влияния индуцированных в апоптоз в условиях скученности и обеднения культуральной среды клеточных и гуморальных компонентов нестимулированных, аCD3- и дексаметазон-стимулированных клеток на аутологичные лимфоциты, пролиферирующие в физиологических условиях у здоровых людей и пациентов с РА. Сравнительный анализ качественного характера выявил особенности процессов апоптоза Т-лимфоцитов у здоровых и больных людей. Также было определено, что показатели раннего и позднего апоптоза «первично» индуцированной в апоптоз культуры и нормально пролиферирующих клеток после переноса к ним клеточных и гуморальных компонентов апоптотической культуры здоровых людей и пациентов с РА достоверно не различались, ни исходно, ни в динамике культивирования клеток. При этом впервые было установлено значимое повышение содержания живых Т-клеток в «первично» индуцированных, не стимулированных и стимулированных дексаметазоном (1×10^{-4} М) пробах больных относительно аналогичных культур здоровых доноров и отсутствие различий между «вторично» индуцированными культурами и при стимуляции клеток антителами к CD3.

Заключение. Увеличение числа живых клеток в культурах больных РА относительно показателей здоровых людей на фоне отсутствия значимых различий по параметрам активационного апоптоза свидетельствует о вкладе неавтономных эффектов апоптоза в клеточный гомеостаз у пациентов с РА.

Ключевые слова: индукция апоптоза, неавтономные эффекты апоптоза, ревматоидный артрит.

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

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

✉ Блинова Елена Андреевна, e-mail: blinovaelena-85@yandex.ru.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом при НИИФКИ (протокол № 107 от 15.06.2018).

Для цитирования: Абрамова Т.Я., Цура В.А., Блинова Е.А., Моренкова А.Ю., Чумасова О.А., Сультян А.Э., Сизиков А.Э., Козлов В.А. Индукция апоптоза лимфоцитов здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом в условиях «клеточного соседства» *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 155–163. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-155-163>.

УДК 616-008.853.2-091.818-092.4:576.5

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-155-163>

Induction of lymphocyte apoptosis in healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis under “cellular neighborhood” *in vitro*

Abramova T.Ya.^{1,2}, Tsura V.A.², Blinova E.A.¹, Morenkova A.Yu.¹, Chumasova O.A.¹, Sulutian A.E.¹, Sizikov A.E.¹, Kozlov V.A.^{1,2}

¹ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

² Novosibirsk State Medical University (NSMU)
52, Krasny Av., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the features of T-lymphocyte apoptosis induced by components of autologous apoptotic cultures *in vitro* in norm and rheumatoid arthritis in the context of «cellular neighborhood».

Materials and methods. Subjects of the study were blood samples of patients with rheumatoid arthritis (RA) and healthy women of comparable age. Developed protocol allowed to differentially evaluate the parameters of proliferation, early and late stages of apoptosis in the «primary» (CFSE⁻) and «secondary» (CFSE⁺) induced apoptotic T-lymphocyte cultures. It was estimated the effect of cellular and humoral components of unstimulated, anti-CD3- and dexamethasone-stimulated cells under the conditions of over-crowding and depleted culture media on autologous lymphocytes, cultured under physiological conditions, in norm and RA.

Results. Comparative qualitative analysis revealed the features of the processes of T-lymphocyte apoptosis in norm and pathology. Also, the parameters of early and late stages of apoptosis of a «primary» induced culture and «secondary» induced cells after transferring the cellular and humoral components of apoptotic cultures did not differ significantly either initially or during culturing in both investigated groups. But it was a significant increase in the amount of living T-cells in «primary»-induced unstimulated and dexamethasone-stimulated RA patients' cultures compared to similar donors' cultures.

Conclusion. There was no difference between stimulated with anti-CD3 antibodies cells and the «secondary» induced cultures. Taking into account the absence of significant differences in the parameters of activation apoptosis, the increased number of living cells in RA patients' cultures relative to donors' is evidence of contribution of non-autonomous apoptosis effects to cellular homeostasis in RA.

Key words: induction of apoptosis, non-autonomous effects of apoptosis, rheumatoid arthritis.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the government of Novosibirsk region as part of the research project No. 18-44-540012.

Conformity with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Protocol No. 107 of 15.06.2018).

For citation: Abramova T.Ya., Tsura V.A., Blinova E.A., Morenkova A.Yu., Chumasova O.A.1, Sulutian A.E., Sizikov A.E., Kozlov V.A. Induction of lymphocyte apoptosis in healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis under “cellular neighborhood” *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 155–163. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-15-163>.

ВВЕДЕНИЕ

Патогенез ревматоидного артрита (РА) – одного из самых распространенных аутоиммунных воспалительных заболеваний суставов в числе многих причин ассоциирован с ослаблением апоптоза, обуславливающего формирование аутоиммунного воспаления вследствие нарушения процесса выбраковки аутоспецифичных клонов лимфоцитов [1, 2].

Как известно, гомеостатическое равновесие в организме поддерживается процессами пролиферации и гибели клеток, при этом апоптоз является наиболее физиологичной из всех форм клеточной гибели, «тихим» механизмом элиминации клеток [3]. Изначально апоптоз считался автономным процессом, в настоящее время все более очевидными становятся неавтономные эффекты процессов апоптоза на пролиферацию, миграцию, морфологию, а также гибель соседних клеток [4]. Установлено, что апоптотические клетки могут продуцировать и секретировать диффундирующие митогенные сигналы [5]. Кроме того, механическое воздействие – изменение напряжения и ремоделирования – в близлежащих тканях также относят к неавтономным эффектам апоптоза [6].

При распаде клеточных структур на отдельные фрагменты в конечном итоге процессов апоптоза и почкования плазматической мембраны образуются апоптотические тельца. Апоптотические тельца, экзосомы и эктосомы относят к числу микровезикул, выполняющих значимую роль в транспортировке различных белков, мРНК и микроРНК в клетке [7]. Показано, что микровезикулы играют важную роль в патофизиологии РА: в экспериментальной модели РА было установлено, что они способны индуцировать в Т-клетках резистентность к апоптозу. Кроме того, было определено, что при ревматологических заболеваниях происходит образование иммунных комплексов на основе микровезикул. Так, было выявлено увеличение количества IgM, связанного с циркулирующими микровезикулами в плазме пациентов с РА по сравнению с контролем. Как известно, отложение иммунных ком-

плексов в суставных тканях является одним из основных патогенетических механизмов воспаления при РА [8].

Таким образом, представление о механизмах развития РА достигло нового уровня, связанного с выяснением ряда патогенетических составляющих аутоиммунного процесса, в частности, значимой роли неавтономных эффектов апоптоза – влияния апоптотирующих клеток и высвобождаемых ими сигналов на клеточное сообщество. В контексте приведенных данных исследование влияния клеточных и гуморальных компонентов культуры клеток, апоптотирующей в условиях скученности и обеднения питательной среды на аутологичные нормально пролиферирующие *in vitro* лимфоциты здоровых людей и пациентов с РА, является перспективным направлением научного поиска, конечная цель которого – определение эффекторных молекул указанных дисфункций.

Целью настоящего исследования являлось изучение особенностей апоптоза Т-лимфоцитов, индуцированных клеточными и гуморальными компонентами аутологичной апоптотической культуры, в условиях «клеточного соседства» *in vitro* у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась периферическая кровь 11 условно здоровых женщин, не имеющих аутоиммунных, острых и обострения хронических заболеваний, средний возраст группы составил ($40,5 \pm 2,3$) лет, а также периферическая кровь 8 больных РА женщин (средний возраст ($39,0 \pm (30,5-59,5)$ лет), находившихся на лечении в клинике ФГБНУ НИИФКИ г. Новосибирска. У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на проведение необходимых манипуляций.

Выделенная на градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,078) (BioClot GmbH, Германия) лимфоцитарная фракция клеток была распределена на два варианта культуры. Первый

вариант (нормально пролиферирующая (НП)) – семь лунок по $5,0 \times 10^5$ кл./0,5 мл полной культуральной среды (ПКС), окрашенных флуоресцентным красителем CFSE (Molecular probes, USA), (CFSE⁺). В составе ПКС – среда RPMI-1640 (ООО «Биолот», г. Санкт-Петербург, Россия), тиенам (ЗАО «ОПТАТ», Россия), L-глутамин (Gerbu, Biotechnik GmbH, Германия), буферный раствор Hepes (Gerbu, Biotechnik GmbH, Германия), фетальная телячья сыворотка (FCS) (Hy Clone, США). Второй вариант культуры (апоптотическая (АК)) – три лунки (нестимулированные клетки aCD3⁻ (1 мкг/мл, МедБиоСпектр, г. Москва, Россия) и дексаметазон-стимулированные (1×10^{-4} М) по 2×10^6 кл./150,0 мкл обедненной (1% FCS) ОС среды (CFSE⁻).

На 4-е сут инкубации в термостате (37 °C, 5%-й CO₂) апоптотическая культура (клетки и супернатант отдельно) была перенесена к лимфоцитам, пролиферирующим в условиях ПКС. Далее проводилось сокультивирование проб, получивших условные названия: 1 – контроль – контрольное культивирование лимфоцитов в ПКС; 2 – контроль апоптоза – к НП лимфоцитам была добавлена клеточная часть нестимулированных клеток АК; 3 – контроль апоптоза супернатант – сокультивирование НП в ПКС и перенесенного к ней супернатанта от нестимулированной АК; 4 – aCD3 – НП культура и клетки АК, стимулированные aCD3; 5 – aCD3 супернатант – НП лимфоциты и супернатант от АК, стимулированной aCD3; 6 – Деха – сокультивирование НП лимфоцитов в ПКС и АК, обработанной дексаметазоном (1×10^{-4} М); 7 – Деха супернатант – НП лимфоциты и супернатант от АК, обработанной дексаметазоном.

На 7-е сут на цитофлуориметре BD FACS Canto II в популяции Т-лимфоцитов (CD3⁺) с помощью набора с аннексином V (AnV) и интеркалирующим красителем 7AAD (Becton Dickinson, США) определялся уровень раннего (AnV⁺/7AAD⁻, %) и позднего (AnV⁺/7AAD⁺, %) апоптоза в нативных, а также в контрольных aCD3⁻ и дексаметазон-стимулированных вариантах. Для выявления популяции живых клеток на предварительном этапе по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния отделяли клеточный дебрис и клетки, находящиеся на стадии позднего некроза. В областях гистограмм, представленных живыми и находящимися в инициальных фазах апоптоза лимфоцитами, в каждой пробе устанавливалась категория (AnV⁻/7AAD⁻) живых клеток [9].

Статистическая обработка данных проводилась с применением методов непараметрической статистики Statistica 6.0. В анализе были ис-

пользованы U-критерий Манна – Уитни, парный критерий Вилкоксона и ранговая корреляция по методу Спирмена (r). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха ($Me (Q_{25}-Q_{75})$). Различия между группами считались статистически значимыми при достигнутом уровне $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На начальном этапе работы нами были проведены исследования, направленные на определение условий индукции апоптотической гибели клеток в условиях скученности и обеднения культуральной среды («первично» индуцированная культура). Оптимизация условий индукции апоптоза позволила определить характер воздействия клеточных и гуморальных компонентов этих апоптотических культур на аутологичные клетки, находившиеся в физиологических условиях («вторично» индуцированная культура). В результате применения данного методологического подхода были оценены параметры раннего и позднего апоптоза субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови здоровых людей и пациентов с РА в модели «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотирующих клеток.

На следующем этапе проводился сравнительный анализ полученных *in vitro* результатов раннего и позднего апоптоза нативных aCD3⁻ и дексаметазон-стимулированных Т-лимфоцитов здоровых людей и пациентов с РА. При этом достоверных различий между группами не выявлено. Уровни раннего и позднего апоптоза «первично» индуцированной в апоптоз культуры и параметры апоптоза нормально пролиферирующих клеток после переноса к ним клеточных и гуморальных компонентов апоптотической культуры достоверно не различались – ни исходно, ни в динамике культивирования клеток. Вместе с тем в процессе анализа обращали на себя внимание внутригрупповые особенности влияния апоптотических факторов. В связи с этим нами был проведен сравнительный анализ качественного характера для выявления вклада в процессы апоптоза анализируемых факторов у здоровых людей и пациентов с РА (таблица).

В частности, у пациентов с РА было определено наличие прямых корреляционных зависимостей между количеством лимфоцитов, находящихся в стадии раннего апоптоза пробы «Контроль» и содержанием аналогичных клеток во всех вариантах культур, меченных CFSE (культура – реципиент) за исключением группы «aCD3 супернатант».

Т а б л и ц а
T a b l e

Параметры раннего и позднего активационного апоптоза в норме и при ревматоидном артрите (РА), $Me (Q_{25}-Q_{75})$
 Parameters of early and late stages of activation apoptosis in normal conditions and RA, $Me (Q_{25}-Q_{75})$

Проба Sample	Здоровые доноры, $n = 11$ Healthy donors, $n = 11$		Больные РА, $n = 8$ Patients with RA, $n = 8$	
	Ранний апоптоз, % Early stage of apoptosis, %	Поздний апоптоз, % Late stage of apoptosis, %	Ранний апоптоз, % Early stage of apoptosis, %	Поздний апоптоз, % Late stage of apoptosis, %
Начальный уровень Initial level	15,7 (13,1–17,9)	0,0 (0–0,35)	14,15 (7,0–17,8)	0 (0–0,1)
Контроль Control	12,4 (7,5–13,5)	2,2 (0,4–9,7)	9,6 (8,1–33,0)	1,7 (0,6–23,7)
Контроль апоптоза (CFSE ⁺) Control of apoptosis (CFSE ⁺)	18,0 (5,1–25,5)	7,0 (3,3–22,4)	15,8 (10,6–35,7)	1,2 (0,6–28,9)
Контроль апоптоза (CFSE ⁻) Control of apoptosis (CFSE ⁻)	20,0 (6,5–43,7)	21,6 (1,9–55,3)	8,6 (7,2–19,8)	0,3 (0,1–25,6)
Контроль апоптоза супернатант Control of apoptosis supernatant	19,0 (13,2–24,1)	2,9 (1,9–49,4)	15,1 (8,0–43,0)	2,1 (0,8–28,7)
aCD3 (CFSE ⁺) aCD3 (CFSE ⁺)	20,4 (17,3–38,6)	13,3 (8,0–58,3)	37,0 (19,9–43,5)	4,9 (3,2–27,7)
aCD3 (CFSE ⁻) aCD3 (CFSE ⁻)	17,0 (8,4–59,6)	17,1 (1,2–76,4)	27,7 (19,2–47,1)	5,8 (0,2–37,5)
aCD3 супернатант aCD3 supernatant	36,0 (25,5–47,0)	3,4 (2,2–28,5)	24,3 (15,6–33,0)	2,7 (1,0–30,4)
Dexa (CFSE ⁺) Dexa (CFSE ⁺)	18,0 (17,6–21,9)	10,9 (3,5–77,7)	15,8 (11,8–40,5)	3,7 (2,8–44,3)
Dexa (CFSE ⁻) Dexa (CFSE ⁻)	14,3 (14,2–16,7)	1,0 (0–19,3)	13,9 (11,2–44,6)	2,65 (0,2–30,4)
Dexa супернатант Dexa supernatant	13,8 (11,2–15,0)	3,4 (2,7–69,0)	20,2 (14,7–38,4)	5,5 (3,8–40,1)

Также положительные связи были установлены между параметрами раннего апоптоза всех видов контроля и содержанием аналогичных апоптотизирующих клеток в дексаметазон-стимулированных культурах (при переносе клеток и супернатанта) как раннего, так и позднего апоптоза и, в частности, положительный характер связи между пробами «Контроль» и Dexa (CFSE⁺) ($r = 0,9$; $p = 0,037$). Тогда как в группе здоровых доноров была определена только одна корреляционная зависимость между содержанием Т-лимфоцитов, находящихся в стадии раннего апоптоза, проб «Контроль» и Dexa (CFSE⁺), и она носила отрицательный характер ($r = -0,9$; $p = 0,037$).

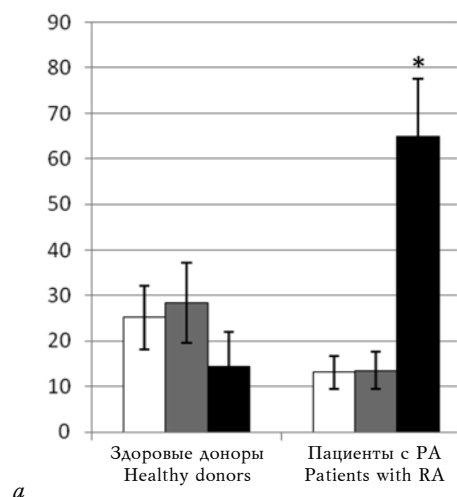
В ходе анализа особенностей раннего апоптоза CFSE⁻ лимфоцитов (культура – донор) было отмечено значимое увеличение показателей aCD3-стимулированных проб у больных РА относительно параметров исходного уровня апоп-

тоза и пробы «Контроль апоптоза (CFSE⁻)»: 27,7 (19,2–47,1)% vs. 8,6 (7,2–19,8)% ($p = 0,034$), в то время как у здоровых людей аналогичные параметры достоверно не изменились 17,0 (8,4–59,6)% vs. 20,0 (6,5–43,7)%, $p > 0,05$).

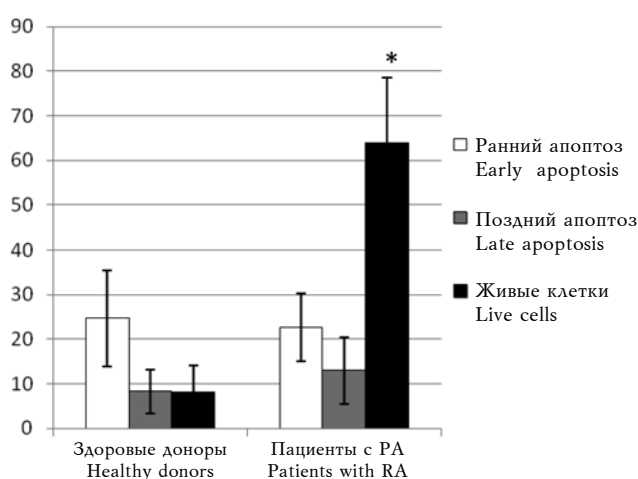
После переноса клеток культуры – донор к культуре-реципиенту («вторичная» индукция) было определено повышение показателей раннего апоптоза пробы «aCD3» (CFSE⁺) vs. «Контроль апоптоза (CFSE⁺)» у больных РА: 37,0 (19,9–43,5)% vs 15,8 (10,6–35,7)%, $p = 0,05$ и не выявлено у здоровых людей: 20,4 (17,3–38,6)% vs. 18,0 (5,1–25,5)%, $p > 0,05$.

При анализе особенностей индукции апоптоза, опосредованного переносом супернатантов, было определено повышение содержания Т-лимфоцитов, находящихся в стадии раннего апоптоза в пробе, стимулированной супернатантом от дексаметазон-индуцированной культуры, отно-

сительно пробы «Контроль апоптоза (CFSE⁺)» у пациентов с РА и не установлено в аналогичных пробах здоровых доноров: 20,2 (14,7–38,4)% vs 15,8 (10,6–35,7)%, $p = 0,05$; 13,8 (11,2–15,0)% vs 18,0 (5,1–25,5)%, $p > 0,05$. Качественный анализ динамики процессов активационного апоптоза Т-лимфоцитов у здоровых людей и пациентов с РА свидетельствовал о существовании различий в характере ответа на неблагоприятные условия, дополнительную активацию aCD3 пролиферативными стимулами и влияние дексаметазона.



a



b

Рисунок. Соотношение живых и апоптотирующих клеток CD3⁺ у здоровых доноров и пациентов с РА, %: а – проба «Контроль апоптоза (CFSE⁺)», б – проба Деха (CFSE⁺). За 100% приняты все CD3⁺ лимфоциты. * достоверные отличия между группами доноров и пациентов с РА, $p < 0,05$

Figure. Proportion of live and apoptotic CD3⁺ cells from healthy individuals and patients with RA, %: а – a sample «Control of apoptosis (CFSE⁺)», б – a sample of «Dexa (CFSE⁺)». All CD3⁺ lymphocytes are taken for 100%. * significant differences between groups of donors and patients with RA, $p < 0.05$

Таким образом, исследование динамики процессов апоптоза в «первично» (CFSE⁺) и «вторично» (CFSE⁺) индуцированных культурах, выявили различия между группами здоровых доноров и пациентов с РА по содержанию живых клеток в (CFSE⁺) культуре и отсутствие значимых различий по параметрам раннего и позднего активационного апоптоза нативных, aCD3⁺ и дексаметазон-стимулированных Т-клеток периферической крови.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основанием для проведения данной работы послужили публикации о неавтономных эффектах апоптотирующих и пролиферирующих клеток [3, 10]. Во избежание нарушения целостности или гиперплазии тканей количество и качество клеток в тканях контролируются несколькими механизмами. В частности, неавтономный апоптоз может индуцироваться различными скоростями

пролиферации или метаболического статуса [11], а развитие деструктивного пролиферативного синовита ассоциировано с нарушением баланса процессов пролиферации и апоптоза [2]. Такие конкурентные клеточные взаимодействия выявлены в экспериментах на животных, в том числе млекопитающих и у человека [12–16].

В нашем исследовании, несмотря на выявленные в процессе качественного анализа внутригрупповые особенности активационного апоптоза, при проведении сравнительного анализа параметров раннего и позднего апоптоза нативных, контрольных, aCD3⁺ и дексаметазон-стимулированных Т-лимфоцитов здоровых людей и пациентов с РА достоверных различий между группами не выявлено – ни в «первично» индуцированной культуре, ни в результате сокультивирования после переноса апоптотирующей культуры к нормально пролиферирующим клеткам. Произошло увеличение числа живых клеток в «первично» индуциро-

ванных культурах, находящихся в условиях скученности и обеднения среды в пробах «Контроль апоптоза» и Деха у пациентов с РА, расцененное нами как неавтономный эффект апоптоза.

По литературным данным, существуют два ключевых механизма, посредством которых апоптотирующие клетки могут неавтономно оказывать влияние на окружение: 1) механическое воздействие – изменение напряжения и ремоделирование близлежащих тканей; 2) высвобождение сигналов отмирающими клетками [3, 10]. Как правило, нежелательные клетки устраняются путем апоптоза и удаляются. Однако недавние исследования показали, что скученность и увеличение механического давления являются триггером экстрюзии клеток, при котором апоптотические раздражители нуждаются в передаче сигналов S1P и вызывают опосредованное актомиозином сужение апикальной части, а дефекты надлежащей экстрюзии клеток способствуют опухолевой прогрессии [17]. Предполагается, что усиление скученности индуцирует апоптотическую гибель клеток в культуре эпителиальных клеток млекопитающих посредством активации p53 [11]. В условиях полярно-дефицитной конкуренции клеток механическое напряжение активизирует регулятор цитоскелета ROCK, что приводит к повышению активности p53 через активацию p38 [11, 17].

Вторым из известных факторов неавтономного влияния апоптоза является способность апоптотирующих клеток к продукции и секреции диффундирующих митогенных сигналов [5]. Характер данных сигналов варьирует в зависимости от ткани и организма, но в качестве кандидатов, запускающих пролиферацию в соседних клетках, были идентифицированы такие сигнальные молекулы, как Wnt, Notch, FGF, TGF β , простагландин E2. Известно, что нарушение клеточного гомеостаза при РА связано с балансом процессов пролиферации и апоптоза. Известно также, что основными медиаторами, приводящими к развитию синовита при РА, являются цитокины, секретируемые Т-лимфоцитами (IFN γ , IL-17), стимулирующие синовиоциты и макрофаги, которые, в свою очередь, продуцируют такие молекулы, как IL-1, IL-6, IL-23, TNF, простагландин E2, оксид азота, колониестимулирующий FGF и TGF β . Таким образом, в процессе аутоиммунного воспаления нарабатываются молекулы, многие из которых определяют неавтономные эффекты апоптоза, являясь кандидатами в факторы, запускающими пролиферацию в соседних клетках.

Следует отметить, что увеличение числа живых клеток в культуре Т-лимфоцитов больных

людей может быть обусловлено как апоптоз-индуцированной пролиферацией, так и процессами анастаза (от греч. – возрождение), выявленной недавно возможностью восстановления поздних стадий апоптоза, включая этапы митохондриального высвобождения цитохрома С, активацию каспаз, фрагментацию ядер и образования апоптотических телец [18].

В нашем исследовании обращало на себя внимание достоверное увеличение живых клеток в «первично» индуцированной в апоптоз культуре и отсутствие значимых различий по уровню живых лимфоцитов в «культуре-реципиенте» после трансплантации. Следует отметить также высокую долю живых клеток в пробах, активированных дексаметазоном, в то время как в культуре, стимулированной CD3-антителами, у пациентов с РА повышения содержания живых клеток не произошло. В литературе имеются данные о стимулирующем влиянии дексаметазона на пролиферативную активность Т-лимфоцитов после недельного культивирования [19]. Поскольку в наших исследованиях во вторичной культуре, индуцированной посредством переноса апоптотических клеток, сохраняется способность Т-лимфоцитов к активационному апоптозу на фоне ослабления способности к пролиферации, с позиций трансляционной медицины представляется перспективным изучение возможности воздействия активированных *in vitro (ex vivo)* аутологичных клеток, подвергнутых активационному апоптозу в условиях скученности и обеднения культуральной среды на течение воспаления и процессы апоптоза в пораженных суставах у больных РА. Учитывая отсутствие различий по параметрам активационного апоптоза в условиях «клеточного соседства» между здоровыми людьми и пациентами с РА, по нашим предположениям, возможно, важную роль в патогенезе ревматоидного артрита играет не ослабление процессов апоптоза, а его неавтономные эффекты, обуславливающие развитие деструктивного пролиферативного синовита – центрального звена патогенеза РА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, создание модели активационного апоптоза в условиях скученности и обеднения культуральной среды, а также трансплантация клеток и перенос супернатанта апоптотирующей культуры к аутологичным пролиферирующим клеткам и дальнейшее сокультивирование в условиях «клеточного соседства» позволили не только установить особенности апоптоза нативных, аCD3- и дексаметазон-стимулированных клеток здоровых

людей и пациентов с РА, но и выявить некоторые неавтономные эффекты апоптоза. Впервые установлено увеличение числа живых клеток в культурах больных РА относительно показателей здоровых людей на фоне отсутствия значимых различий по параметрам апоптоза. Указанные особенности выявлены в «первично» индуцированных (CFSE⁻) культурах нестимулированных и стимулированных дексаметазоном клеток и не определены во «вторично» стимулированных (CFSE⁺) культурах и при активации клеток антителами к CD3.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Панафидина Т.А., Кондратьева Л.В., Герасимова Е.В. Коморбидность при ревматоидном артрите. *Научно-практическая ревматология*. 2014; 52 (3): 283–289. [Panafidina T.A., Kondratyeva L.V., Gerasimova E.V., Novikova D.S., Popkova T.V. Comorbidity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology Science and Practice*. 2014; 52 (3): 283–289 (in Russ.)]. DOI: 10.14412/1995-4484-2014-283-289.
2. Арефьева А.С. Роль апоптоза в развитии системных аутоиммунных заболеваний. *Иммунология*. 2014; 35 (2): 103–107. [Arefeva A.S. Role of apoptosis in the development of systemic autoimmune diseases. *Immunology*. 2014; 35 (2): 103–107 (in Russ.)].
3. Pérez-Garijo A., Steller H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development*. 2015; 142: 3253–3262. DOI: 10.1242/dev.127878.
4. Fuchs Y., Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*. 2011; 147 (4): 742–758. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.033.
5. Morata G., Shlevkov E., Pérez-Garijo A. Mitogenic signaling from apoptotic cells in Drosophila. *Dev. Growth Differ.* 2011; 53: 168–176. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2010.01225.x.
6. Pérez-Garijo A., Fuchs Y., Steller H. Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway. *Elife*. 2013; 2: 18. DOI: 10.7554/eLife.01004.
7. Титов В.Н. Микрочастицы плазмы крови, микровезикулы, экзосомы, тельца апоптоза и макрофаги Купфера в печени – поздняя в филогенезе система реализации биологической функции эндоекологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (7): 29–39. [Titov V.N. The micro-particles of blood plasma, micro-vesicles, exosomes, apoptotic bodies and Kupffer macrophage in liver: late in phylogenesis system of realization of biological function of endoeology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2014; 59 (7): 29–39 (in Russ.)].
8. Withrow J., Murphy C., Liu Y. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2016; 18: 12. DOI: 10.1186/s13075-016-1178-8.
9. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Цитометрический анализ в клинической иммунологии. Екатеринбург: УрО РАН, 2011: 220. [Khaydukov S.V., Zurochka A.V., Chereshevnev V.A. Cytometric analysis in the clinical immunology. Ekaterinburg: UrO RAN Publ., 2011: 220 (in Russ.)].
10. Eroglu M., Derry W.B. Your neighbours matter – Non-autonomous control of apoptosis in development and disease. *Cell Death Differ.* 2016; 23: 1110–1118. DOI: 10.1038/cdd.2016.41.
11. Cao Y., Liu J. Impaired apoptosis of peripheral blood CD4⁺T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*. 2015; 31 (5): 682–685. PMID: 25940298 [Indexed for MEDLINE].
12. Сепиашвили Р.И., Шубич М.Г., Колесникова Н.В., Славянская Т.А., Ломтатидзе Л.В. Апоптоз в иммунологических процессах. *Аллергология и иммунология*. 2015; 16 (1): 101–107. [Sepiashvili R.I., Shubich M.G., Kolesnikova N.V., Slavyanskaya T.A., Lomtadize L.V. Apoptosis in the immunological processes. *Allergology and Immunology*. 2015; 16 (1): 101–107 (in Russ.)].
13. Сергеева Т.Ф., Ширманова М.В., Загайнова Е.В. Современные методы исследования апоптотической гибели клеток. *Современные технологии в медицине*. 2015; 7 (3): 172–182. [Sergeeva T.F., Shirmanova M.V., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A. Modern Research Techniques of Apoptotic Cell Death. *Modern Technologies in Medicine*. 2015; 7 (3): 172–182]. DOI: 10.17691/stm2015.7.3.21.
14. Brakus S.M., Govorko D.K., Vukojevic K., Jakus I.A., Carev D., Petricevic J., Saraga-Babic M. Apoptotic and anti-apoptotic factors in early human mandible development. *Eur. J. Oral. Sci.* 2010; 118 (6): 537–546. DOI: 10.1111/j.1600-0722.2010.00777.
15. Абрамова Т.Я., Цура В.А., Блинова Е.А., Козлов В.А. Влияние аутологических апоптотических клеточных культур на показатели ранней и поздней стадии апоптоза Т-лимфоцитов у здоровых доноров. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11 (2): 236–238. [Abramova T.Ya., Tsura V.A., Blinova E.A., Kozlov V.A. Effect of autologous apoptotic cell cultures on the parameters of early and late apoptososis of T lymphocytes from healthy donors. *Russian Journal of Immunology*. 2017; 11 (2): 236–238 (in Russ.)].
16. Абрамова Т.Я., Цура В.А., Блинова Е.А., Моренкова А.Ю., Козлов В.А. Активация ранней стадии апоптоза Т-лимфоцитов *in vitro* посредством переноса компонентов аутологичной апоптотической культуры у пациентов с ревматоидным артритом. *Медицинская иммунология*. 2018; 20 (2): 255–262. [Abramova T.Ya., Tsura V.A., Blinova E.A., Morenkova A.Yu., Kozlov V.A. *In vitro* activation of early-stage apoptosis of T lymphocytes by transferring apoptotic autologous cell culture components in patients with rheumatoid arthritis. *Medical Immunology (Russia)*. 2018; 20 (2): 255–262 (in Russ.)].
17. Chen G.Y., Tang J., Zheng P. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune re-

- sponses. *Science*. 2009; 323: 1722–1725. DOI: 10.1126/science.1168988.
18. Tang H.L., Tang H.M., Hardwick J.M., Chiu Fung M. Strategies for tracking anastasis, a cell survival phenomenon that reverses apoptosis. *Journal of Visualized Experiments*. 2015; 96: 1–13. PMID: 25742050. DOI: 10.3791/51964.
19. Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Yurova K.A., Khasiakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Dose-dependent effects of dexamethasone on functional activity of T-lymphocytes with different grades of differentiation. *Molecular Biology*. 2015; 49 (1): 130–137. DOI: 10.1134/S0026893314060065.

Вклад авторов

Абрамова Т.Я. – разработка концепции и дизайна; анализ и интерпретация данных; обоснование рукописи или проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Цура В.А. – анализ и интерпретация данных. Блинова Е.А. – разработка концепции и дизайна; анализ и интерпретация данных; обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Моренкова А.Ю. – анализ и интерпретация данных. Чумасова О.А. – анализ и интерпретация данных; Сулутьян А.Э. – анализ и интерпретация данных. Сизиков А.Э. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Козлов В.А. – обоснование рукописи, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Authors contribution

Abramova T.Ya. – conception and design; analysis and interpretation of data; justification of the manuscript and critical revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript for publication. Tsura V.A. – analysis and interpretation of data. Blinova E.A. – conception and design; analysis and interpretation of data; justification of the manuscript and critical revision of the manuscript for important intellectual content. Morenkova A.Yu. – analysis and interpretation of data. Chumasova O.A. – analysis and interpretation of data. Sulutian A.E. – analysis and interpretation of data. Sizikov A.E. – critical revision of the manuscript for important intellectual content. Kozlov V.A. – justification of the manuscript, final approval of the manuscript for publication.

Сведения об авторах

Абрамова Татьяна Яковлевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-6947-2212.

Цура Василина Александровна, студент VI курса, медико-профилактический факультет, НГМУ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-2394-7187.

Блинова Елена Андреевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-3327-3630.

Моренкова Анастасия Юрьевна, клинический ординатор, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-0980-1157.

Чумасова Оксана Александровна, канд. мед. наук, врач-ревматолог, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-3797-6392.

Сулутьян Анна Эдуардовна, канд. мед. наук, врач-ревматолог, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-8487-1094.

Сизиков Алексей Эдуардович, канд. мед. наук, врач-ревматолог, зав. отделением ревматологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-7213-7482.

Козлов Владимир Александрович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИФКИ, зав. лабораторией клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

(✉) Блинова Елена Андреевна, e-mail: blinovaelena-85@yandex.ru.

Authors information

Abramova Tatiana Ya., DM, Leading Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-6947-2212.

Tsura Vasilina A., VI course Student, Department of Biochemistry, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2394-7187.

Blinova Elena A., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3327-3630.

Morenkova Anastasia Yu., Clinical Intern, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0980-1157.

Chumasova Oksana A., PhD, Rheumatologist, Rheumatology Department, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3797-6392.

Sulutian Anna Ed., PhD, Rheumatologist, Rheumatology Department, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8487-1094.

Sizikov Alexey Ed., PhD, Head of the Rheumatology Department, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7213-7482.

Kozlov Vladimir A., DM, Professor, Academician of RAS, Scientific Supervisor of RIFCI, Head of the Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

(✉) Blinova Elena A., e-mail: blinovaelena-85@yandex.ru.

Поступила в редакцию 29.06.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Received 29.06.2018
Accepted 17.12.2018

Распределение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при бронхиальной астме

Барковская М.Ш., Блинова Е.А., Коняхина Ю.В., Леонова М.И.,
Непомнящих В.М., Демина Д.В., Кожевников В.С., Козлов В.А.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

РЕЗЮМЕ

Цель. Охарактеризовать длину теломерных последовательностей на отдельных плечах индивидуальных хромосом у больных бронхиальной астмой (БА).

Материалы и методы. Были использованы метафазные пластинки, полученные из мононуклеарной фракции периферической крови пациентов с БА ($n = 10$, средний возраст $(44 \pm 8,2)$ года) и условно-здоровых доноров ($n = 10$, средний возраст $(44 \pm 8,4)$ года). Для измерения длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом использовали количественную флуоресцентную гибридизацию *in situ*. Новое программное обеспечение (MeTeLen, <http://www.bionet.nsc.ru/en/development/application-development/development-of-a-computer/metelen.html>) применялось для оценки количества теломерных повторов на изображениях метафазных хромосом.

Результаты. Показано, что теломерные последовательности на отдельных плечах ряда индивидуальных хромосом (4q, 5q, 9p, 10q, 11p, 13p, 15q, 18q, 19q) у пациентов с БА укорочены по сравнению с длиной теломер у доноров ($p < 0,05$; критерий Манна – Уитни). Также для исследуемых групп были определены теломерные последовательности, укороченные и удлиненные относительно средней длины теломер по группе ($p < 0,05$; критерий Вилкоксона). Были обнаружены следующие различия и сходства между теломерными профилями пациентов и доноров: у пациентов теломерные последовательности 4p, 6q, 8p были удлинены, а 2q, 9q, 11p, 15 q – укорочены относительно средней длины теломер. При этом длина данных теломерных последовательностей не отличалась от средней длины теломер в группе доноров. Вместе с тем в обеих группах теломерные последовательности 12p, 16p, 17p, 19p были короче, а 3p – длиннее, чем средняя длина теломер.

Заключение. Таким образом, обнаружено уменьшение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с БА в сравнении с донорами, а также выявлены особенности распределения длины теломерных последовательностей при данной патологии. Мы полагаем, что механизмы изменения теломерного профиля при БА требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: длина теломер, количественная флуоресцентная гибридизация *in situ* (Q-FISH), теломерный профиль, хромосомы, бронхиальная астма.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствия принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом при НИИФКИ (протокол № 111 от 06.11.2018).

Благодарности. Авторы статьи признательны центру коллективного пользования НИИФКИ за возможность использования оборудования (флуоресцентный микроскоп Axioscop 40, ZEISS,

✉ Барковская Маргарита Шамилевна, e-mail: margaritabarkovskaya@gmail.com.

Германия). А также выражают благодарность лично д-ру биол. наук, профессору Н.Б. Рубцову за консультативную поддержку при проведении цитогенетического анализа.

Для цитирования: Барковская М.Ш., Блинова Е.А., Коняхина Ю.В., Леонова М.И., Непомнящих В.М., Демина Д.В., Кожевников В.С., Козлов В.А. Распределение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при бронхиальной астме. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 164–174. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-164-174>.

УДК 616.248:576.316

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-164-174>

Telomere length distribution on individual chromosome arms in patients with bronchial asthma

Barkovskaya M.Sh., Blinova E.A., Konyahina J.V., Leonova M.I., Nepomniashchikch V.M., Demina D.V., Kozhevnikov V.S., Kozlov V.A.

*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation*

ABSTRACT

Objective. The purpose of this study was to evaluate the length of telomeres in the arms of individual chromosomes in patients with bronchial asthma (BA).

Materials and methods. The study included patients with BA ($n = 10$, the mean age (44 ± 8.2) years) and healthy donors ($n = 10$, the mean age (44 ± 8.4) years). Metaphase spreads obtained from peripheral blood mononuclear cells were used. At the time of sampling BA patients received treatment at the Clinic of Immunopathology, Novosibirsk. BA was diagnosed by physicians according to GINA-2016.

For measurement of telomere length on individual chromosome arms we used quantitative fluorescent *in situ* hybridization with a PNA-probe specific for telomeres. We used inverted DAPI banding for chromosome identification (according to ISCN-2013). For each individual 5 metaphase cells were analyzed. We applied the newly developed MeTeLen software to estimate the telomere repeats quantity (<http://www.bionet.nsc.ru/en/development/application-development/development-of-a-computer/metelen.html>) in metaphase images. For enhanced image analysis compared with the previously developed programs, we included estimation of background signal and correction of defects of the optical system.

Results. Comparing of telomere length show, that telomeres in the certain chromosome arms (4q, 5q, 9p, 10q, 11p, 13p, 15q, 18q, 19q) in BA are significantly shorter than in corresponding group of donors ($p < 0.05$, Mann – Whitney U-test). For both studied groups we also evaluated telomere sequences shortened and elongated relative to the average telomere length in the group ($p < 0.05$, Wilcoxon-signed-runk test). The following differences and similarities between the telomere profiles of patients and donors were determined: the telomere sequences 4p, 6q, 8p were elongated and 2q, 9q, 11p, 15q were shortened relative to the average telomere length in BA patients. Moreover, this telomere sequences did not differ from the average telomere length in the group of donors. At the same time, the telomere sequences 12p, 16p, 17p, 19p were significantly shorter, and 3p was longer than the average telomere length in both groups.

Conclusions. We guess, that the observed significant shortening of telomere length on individual chromosome arms in BA, as compared to donors, is relevant in pathogenesis of this disorder. The revealed features of telomere profile of patients with BA may be a result of different telomere length maintenance mechanisms and may influence to the development of asthma that needs further study.

Key words: telomere length, quantitative fluorescent in situ hybridization(Q-FISH), telomere profile, chromosomes, bronchial asthma.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Protocol No. 111 of 06.11.2018).

Acknowledgements. The authors would like to thank the Center for Collective Use at the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology for the opportunity to use the equipment (fluorescent microscope Axioscop 40, ZEISS, Germany). The authors would like to thank Rubtsov N.B., Doctor of Biology, Professor, for his helpful advice on cytogenetic analysis.

For citation: Barkovskaya M.Sh., Blinova E.A., Konyahina J.V., Leonova M.I., Nepomniashchikh V.M., Demina D.V., Kozhevnikov V.S., Kozlov V.A. Telomere length distribution on individual chromosome arms in patients with bronchial asthma. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 164–174. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-164-174>.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время появляются данные, свидетельствующие об ускоренном старении иммунной системы и респираторного тракта при бронхиальной астме (БА) и других хронических бронхолегочных заболеваниях [1–3]. В числе прочих важным маркером старения иммунной системы является длина теломер в лимфоцитах. Теломеры – это нуклеопротеиновые структуры, которые находятся на концах хромосом [4] и служат защитой от «репликативного старения» в результате деления клетки [5].

Показано, что в клетках иммунной системы средняя длина теломер снижается с возрастом [6]. Укорочение средней длины теломер в CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах памяти по сравнению с длиной теломер наивных Т-лимфоцитов сопровождается снижением пролиферативного потенциала Т-клеток памяти [7] и свидетельствует о пролиферативном стрессе. Наиболее выраженное снижение длины теломер вследствие клональной экспансии обнаружено в антиген-специфичных Т-клетках [8]. Для иммунопатологии также характерно снижение длины теломер в иммунокомпетентных клетках вследствие пролиферативного стресса [9]. Лимфоциты периферической крови, несмотря на способность к продукции теломеразы, демонстрируют укорочение средней длины теломер у пациентов с ревматоидным артритом [10], atopическим дерматитом и БА [11] в сравнении со средней длиной теломер доноров. Ряд авторов находит связь между укорочением средней длины теломер и формой БА [12], а также тяжестью [13] и продолжительностью данного заболевания [14].

Известный к настоящему моменту факт, что длина теломер в клетках распределена неравномерно [15] и является индивидуальной наследуемой величиной [16], позволяет задуматься о роли укороченных теломер отдельных хромосом в па-

тогенезе иммуноопосредованных заболеваний. Распределение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом получило название теломерного профиля [16]. Ранее уже была продемонстрирована связь уменьшения длины теломерных последовательностей отдельных хромосом с некоторыми онкологическими заболеваниями [17, 18] и аутоиммунной патологией [19]. Поскольку распределение длины теломер на отдельных хромосомах при астме не охарактеризовано, основной целью данной работы было изучение длины теломерных последовательностей на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с БА в сравнении со здоровыми донорами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 10 пациентов в стадии обострения БА (8 женщин и 2 мужчины). Средний возраст в группе пациентов составил ($44 \pm 8,2$) года. В связи с тем, что длина теломер является возраст-зависимым параметром, группа доноров подбиралась строго по возрасту и полу (8 женщин и 2 мужчины), средний возраст ($44 \pm 8,4$) года. На момент забора материала все пациенты находились на лечении в клинике иммунопатологии НИИФКИ г. Новосибирска. Диагноз БА выставлялся врачами клиники иммунопатологии НИИФКИ в соответствии с GINA-2016.

Метод получения и культивирования клеток периферической крови. Фракцию мононуклеарных клеток (МНК) выделяли из гепаринизированной периферической крови в градиенте плотности фиколл-урографина (стандартная методика). Клетки культивировали в течение 72 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °C в среде RPMI-1640 с содержанием L-глутамина (0,3 мг/мл), гентамицина (50 мкг/мл), тиенама (25 мкг/мл) и 10%-й фетальной бычьей сыворотки (FCS HyClone, Великобритания). Клетки в концентрации 1,5 млн

на 1 мл полной среды культивировали в объеме 2 мл, в 24-луночном плоскодонном планшете. В качестве стимулятора митоза Т-лимфоцитов использовали фитогемагглютинин (РНА), конечная концентрация которого составила 30 мкг/мл (РНА-Р, Sigma, США).

Количественная флуоресцентная гибридизация *in situ*. Для оценки количества теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом использовали метод количественной флуоресцентной гибридизации *in situ* (Q-FISH). Постановку реакции Q-FISH проводили на препаратах метафазных хромосом, приготовленных в соответствии со стандартной методикой из трехсуточной РНА-стимулированной культуры МНК периферической крови [20]. Качество полученных препаратов контролировали на фазово-контрастном микроскопе. Препараты с наилучшим расплыванием метафазных пластинок выдерживали в течение 1 ч при температуре 60 °С и подвергали реакции Q-FISH с использованием зонда РНА (Peptide Nucleic Acid), меченного Cy3 (CCCTAA)₃ (Eurogenetec Ltd., Бельгия) в подобранных нами ранее условиях [21].

Флуоресцентный микроскоп Axioscop 40 (ZEISS, Германия) применялся для микроскопии и регистрации изображения в соответствии с ранее описанной методикой [21]. С целью нормирования осветительной системы использовали флуоресцентные бусы (Fluospheres 0,2 мкм, Life Technologies, США) с оранжевым спектром флуоресценции (540/560 нм), которые предварительно наносились на предметное стекло и заключались в антифэйд. В течение каждой сессии производилась периодическая съемка стекла с бусами таким образом, чтобы для нормировки изображений метафазных пластинок, полученных от одного образца, было не менее 20 изображений бус.

Анализ изображений. Цифровая обработка изображений проводилась в специально созданной программе MeTeLen с учетом времени экспозиции, процедур нормировки и выравнивания, как было описано ранее [21]. Для каждого индивидуума, вовлеченного в исследование, проводился анализ пяти метафазных пластинок. Для идентификации хромосом и их районов согласно международной номенклатуре метафазных хромосом человека An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013) использовали инвертированный DAPI-бэндинг. Номера хромосомам присваивали в программе MeTeLen интерактивно.

Так как плечо метафазных хромосом состоит из двух сестринских хроматид, то для теломеры

соответствующего плеча хромосомы в каждой клетке проводилось четыре измерения, а показатель интенсивности ее сигнала вычислялся как среднее арифметическое этих измерений. Длина теломер конкретного плеча хромосомы выражалась в относительных единицах (отн. ед. представляют собой суммарную интенсивность флуоресценции объекта, выраженную в уровнях серого по 256-битной шкале и нормированную на время экспозиции и интенсивность флуоресцентного сигнала с бус). Поскольку в большинстве случаев идентификация гомологов, имеющих отцовское и материнское происхождение, невозможна, то она не проводилась. Также не проводился анализ длины теломер в плечах Y-хромосомы в связи с их небольшим количеством.

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Применялись методы непараметрической статистики, так как распределение параметров в группах отличалось от нормального. Оценка значимости различий между группами больных и доноров проводилась с использованием критерия Манна – Уитни (U). Для сравнения двух связанных групп применяли непараметрический критерий Вилкоксона. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного размаха Me (Q_{25} – Q_{75}) и минимального и максимального значений. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Считается, что клетки иммунной системы при иммуноопосредованных заболеваниях постоянно находятся в состоянии иммунного ответа, что приводит к снижению средней длины теломер [7]. Для подтверждения этого факта была определена средняя длина всех теломерных последовательностей метафазных хромосом РНА-стимулированных лимфоцитов периферической крови в группах доноров и пациентов. Полученные нами данные подтвердили, что средняя длина теломер при БА достоверно меньше, чем у условно-здоровых доноров (рис. 1).

Графики индивидуальных теломерных профилей, построенные для лиц, включенных в исследование, имели сходный вид распределения теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом. Поэтому общие теломерные профили для групп доноров и пациентов были построены для дальнейшего анализа (рис. 2). Разница в длине теломерных последовательностей отдельных плеч индивидуальных хромосом определялась между группой пациентов и доно-

ров с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни. Сравнение показало, что у пациентов с БА по сравнению с донорами достоверно укорочены теломерные последовательности на следующих хромосомных плечах: 4q, 5q, 9p, 10 q, 11p, 13p, 15q, 18q, 19q (см. рис. 2). Сле-

дует заметить, что укорочение теломер на q-плечах хромосом 9, 11, 13, 16 и 22 носило характер тенденции ($p = 0,052$). При этом ни на одном из плеч исследуемых хромосом теломерные последовательности у пациентов с БА не были удлинены по сравнению со здоровыми донорами.

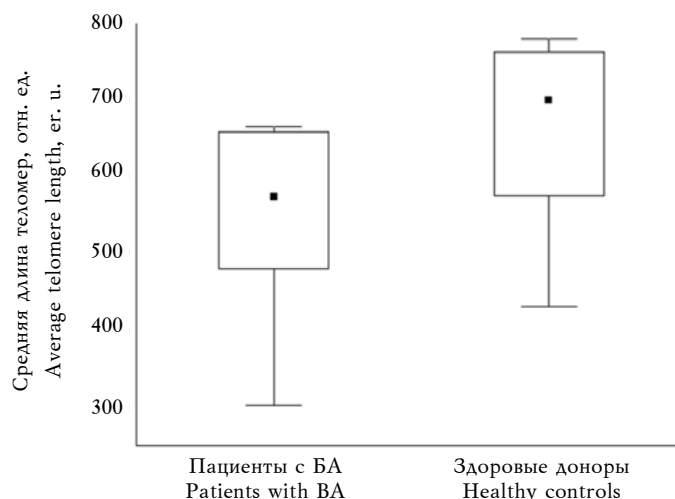


Рис. 1. Средняя длина теломер у пациентов с бронхиальной астмой и условно-здоровых доноров: данные представлены в виде $Me (Q_{25}-Q_{75})$ и минимального и максимального значений, $p < 0,05 (U)$

Fig. 1. Average telomere length of patients with BA and healthy controls: data in the diagram are given as $Me (Q_{25}-Q_{75})$ and minimum and maximum values, r.u. – relative units, $p < 0.05 (U)$

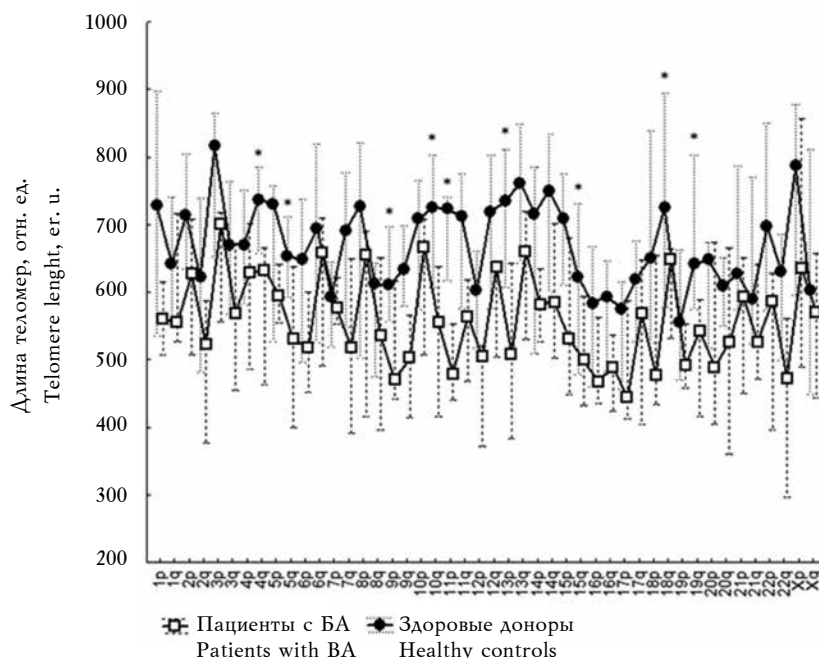


Рис. 2. Теломерные профили пациентов с БА и условно-здоровых доноров: данные представлены в виде $Me (Q_{25}-Q_{75})$. * указаны различия между соответствующими группами, $p < 0,05 (U)$

Fig. 2. Telomere profiles of patients with BA and healthy controls: data are given as $Me (Q_{25}-Q_{75})$, r.u. – relative units. * there are differences between the relevant groups, $p < 0.05 (U)$

Для оценки распределения длины теломерных последовательностей были определены достоверно более короткие и более длинные теломерные последовательности относительно средней длины теломер изучаемых профилей (применялся тест Вилкоксона, уровень статистической значимости $p < 0,05$). Анализ показал, что и в группе пациентов, и в группе доноров р-плечо 3-й хромосомы было достоверно удлинено, а р-плечи хромосом 12, 16, 17 и 19 – достоверно укорочены (таблица). В группе пациентов также была достоверно удлинена теломерная последовательность на р-плече X-хромосомы и достоверно укорочена – на q-плече 22-й хромосомы. При этом в группе здоровых доноров теломерные последовательно-

сти на р-плече X-хромосомы и q-плече 22-й хромосомы были изменены аналогично, но данные изменения носили характер тенденции. Несмотря на выявленные сходства теломерных профилей, при БА были обнаружены теломерные последовательности, которые отличаются по характеру изменения длины от группы здоровых доноров. Так, теломерные последовательности 4p, 6q, 8p были удлинены, а 2q, 9q, 11p, 15q – укорочены у пациентов с БА, но не изменялись в группе здоровых доноров (см. таблицу). Еще одной отличительной чертой БА является меньшее количество относительно укороченных или удлинённых теломерных последовательностей по сравнению с группой здоровых доноров (14 vs 17).

Т а б л и ц а
T a b l e

Характеристика отдельных плеч индивидуальных хромосом с укороченными и удлинёнными теломерными последовательностями у пациентов с БА и здоровых доноров				
Characterization of the arms of individual chromosomes with shortened and elongated telomere sequences in patients with BA and healthy donors				
Плечо индивидуальной хромосомы Arm of individual chromosome	Пациенты с БА Patients with BA		Здоровые доноры Healthy donors	
	длина теломер telomere length	тест Вилкоксона, p Wilcoxon test, p	длина теломер telomere length	тест Вилкоксона, p Wilcoxon test, p
2p	–	–	↑	0,059
2q	↓	0,017	–	–
3p	↑	0,005	↑	0,016
4p	↑	0,037	–	–
4q	–	–	↑	0,009
6q	↑	0,037	–	–
7p	–	–	↓	0,021
8p	↑	0,028	–	–
9q	↓	0,037	–	–
11p	↓	0,047	–	–
12p	↓	0,037	↓	0,005
12q	–	–	↑	0,059
13q	–	–	↑	0,007
14q	–	–	↑	0,037
15q	↓	0,007	–	–
16p	↓	0,028	↓	0,047
17p	↓	0,005	↓	0,012
17q	–	–	↓	0,007
18q	–	–	↓	0,037
19p	↓	0,009	↓	0,005
20p	–	–	↓	0,005
20q	–	–	↓	0,047
22q	↓	0,012	↓	0,059
Xp	↑	0,005	↑	0,059

Примечание. Теломерные последовательности плеча отдельных хромосом, которые удлинены (↑) или укорочены (↓) по сравнению со средней длиной теломер в метафазе. Отличия определялись по критерию Вилкоксона.

Note. The table shows the telomere sequences of the arms of individual chromosomes, which are elongated (↑) or shortened (↓) compared to the average telomere length in metaphase. The differences were determined in the Wilcoxon test.

ОБСУЖДЕНИЕ

Показанное методом Q-FISH укорочение средней длины теломер у пациентов с БА подтверждается данными литературы, в которых описано уменьшение средней длины теломер в Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах, моноцитах и гранулоцитах при таких видах иммунопатологии, как БА, атопический дерматит и ревматоидный артрит [11, 22]. Однако считается, что именно чрезмерно укороченные теломеры могут приводить к нестабильности генома клетки, слиянию хромосом «конец-в-конец», запуску системы репарации ДНК и, в конечном итоге, вызывать апоптоз [7]. Мы установили, что у пациентов с БА была достоверно снижена длина теломер на плечах девяти различных хромосом (4q, 5q, 9p, 10q, 11p, 13p, 15q, 18q, 19q). Это укорочение теломерных последовательностей может быть вызвано усиленной пролиферацией лимфоцитов, которые находятся в состоянии иммунного ответа.

Поскольку в нашем исследовании длина теломер определялась не в абсолютных, а в относительных единицах, мы не можем утверждать, насколько критичным является укорочение теломер при БА. Вместе с тем есть доказательства того, что в клетке достаточно пяти теломер с нарушенной функцией для запуска пролиферативного старения [23]. Известны и другие способы влияния теломер на клетку, например позиционный эффект теломер (telomeric position effect (TPE)). TPE предполагает, что в норме теломеры вызывают «сайленсинг» генов субтеломерных регионов путем блокирования их промоторов [24]. При этом укорочение теломерных последовательностей отменяет репрессию данных генов, усиливая их экспрессию. В настоящее время доказано существование TPE для человеческих генов [25, 26]. Также считается, что укорочение теломер оказывает влияние не только на гены субтеломерных регионов, но и на удаленно расположенные гены (telomere position effect over long distances (TPE-OLD)) [27].

Развитие БА во многом связано с генетической предрасположенностью индивидуума к данному заболеванию. По данным геномных исследований, проводимых в разных популяциях, к одним из наиболее часто идентифицируемых кластеров генов, ассоциированных с БА, относятся локусы на 5-й и 11-й хромосомах [28]. Известно, что 31–33-й регионы q-плеча 5-й хромосомы содержат гены интерлейкина (IL) 3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, GM-CSF, а также иммуноглобулина (Ig) E, которые являются непосредственными участниками гиперчувствительности немедленно-

го типа при атопических заболеваниях. А локус 15.5, расположенный на p-плече 11-й хромосомы, кодирует гены семейства муциновых белков (MUC5AC, MUC5B), нарушенная секреция которых при БА способствует развитию гиперреактивности дыхательных путей [29]. По данным различных исследований, полиморфизм данных генов ассоциирован с развитием БА [28]. Связь данных генетических кластеров с длиной теломер не изучалась. Тем не менее в нашем исследовании наблюдалась уменьшенная длина теломерных последовательностей 5q и 11p. Исходя из чего, можно предположить, что укорочение индивидуальных теломерных последовательностей может вносить свой вклад в патогенетические процессы при астме посредством повышения экспрессии данных генов.

Существует мнение, что снижение длины теломер отражает не столько их укорочение в процессе иммунного ответа, сколько является наследственной чертой [30, 31], которая может влиять на ускоренное старение иммунной системы и нарушение Т-клеточного гомеостаза при иммунопатологии [22, 32]. Поэтому по распределению длины теломер индивидуальных хромосом относительно средней длины теломер были построены теломерные профили для доноров и пациентов, которые демонстрировали некоторое сходство. Полученные общие теломерные профили обеих групп по относительно длинным и относительно коротким теломерным последовательностям во многом совпадали с данными U.M. Martens и соавт. [33], в работе которых было показано, что 12p, 16p, 17p, 17q, 19p, 20q, 22q, также укорочены, а 3p, 4q, 12q, 13q, 14q и Xp удлинены относительно медианы.

Мы считаем, что обнаруженные в нашем исследовании укороченные (12p, 16p, 17p, 17q, 18q, 19p, 20p, 20q, 22q) и удлинённые (2p, 3p, 4q, 12q, 13q, 14q, Xp) последовательности являются конституциональными особенностями теломерного профиля, которые свойственны большинству людей, так как они были обнаружены у здоровых доноров. При этом значительная часть этих теломерных последовательностей (2p, 4q, 7p, 12q, 13q, 14q, 17q, 18q, 20p, 20q) у пациентов с БА не отличалась от средней длины теломер. Такое снижение вариабельности длины теломерных последовательностей может свидетельствовать о своеобразном «стирании» теломерного профиля вследствие высокой пролиферативной нагрузки и ускоренного старения клеток иммунной системы при БА. Примечательно также, что у пациентов с БА были укорочены по сравнению с длиной те-

ломер доноров и относительно короткие последовательности теломерного профиля (11p, 15q) и те, которые не отклонялись от средней длины теломер (4q, 5q, 9p, 10q, 13p, 18q, 19q). При этом относительно длинные последовательности теломерного профиля не были укорочены при БА по сравнению с донорами. Это говорит о том, что в теломерном профиле пациентов с БА уменьшаются определенные теломерные последовательности. По нашему мнению, данные теломерные последовательности на отдельных плечах индивидуальных хромосом при БА могут принимать участие в развитии данного заболевания. В целом выявленные особенности распределения последовательностей теломерного профиля у пациентов с БА свидетельствуют о существовании более сложных механизмов укорочения теломер при данном заболевании, чем пролиферативное старение или наследуемый характер теломерного профиля. Данные механизмы могут опосредоваться различными факторами, такими как активность теломеразы, компоненты Sheltering-комплекса, быстрая делеция теломер или негомологичная рекомбинация теломерных последовательностей [34–36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, была проведена комплексная оценка длины теломер и характеристик теломерного профиля при БА. Установлено, что у пациентов с БА укорочены средняя длина теломер и длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом (4q, 5q, 9p, 10 q, 11p, 13p, 15q, 18q, 19q) по сравнению с этими показателями здоровых доноров. Также были обнаружены различия между теломерными профилями пациентов и доноров: у пациентов теломерные последовательности 4p, 6q, 8p были удлинены, а 2q, 9q, 11p, 15 q – укорочены относительно средней длины теломер. Тогда как в группе доноров длина данных теломерных последовательностей не изменялась. По нашему мнению, укорочение средней длины теломер и длины теломер на отдельных хромосомах является свидетельством более раннего старения иммунной системы у пациентов с БА по сравнению со здоровыми донорами. Выявленные особенности теломерного профиля пациентов могут быть результатом воздействия различных механизмов поддержания длины теломер. А обнаруженные укороченные теломерные последовательности на отдельных плечах индивидуальных хромосом могут быть причастны к патогенезу БА, что требует дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tsuji T., Aoshiba K., Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 174 (8): 886–893. DOI: 10.1164/rccm.200509-1374OC.
2. Albrecht E., Sillanpää E., Karrasch S., Couto Alves A., Codd V., Hovatta I., Buxton J.L., Nelson C.P., Broer L., Hägg S., Mangino M., Willemsen G., Surakka I., Ferreira M.A.R., Amin N., Oostra B.A., Bäckmand H.M., Peltonen M., Sarna S., Rantanen T., Sipilä S., Korhonen T., Madden P.A., Gieger C., Jörres R.A., Heinrich J., Behr J., Huber R.M., Peters A., Strauch K., Wichmann H.E., Waldenberger M., Blakemore A.I., de Geus E.J., Nyholt D.R., Henders A.K., Piirilä P.L., Rissanen A., Magnusson P.K., Vieucla A., Pietiläinen K.H., Martin N.G., Pedersen N.L., Boomsma D.I., Spector T.D., van Duijn C.M., Kaprio J., Samani N.J., Jarvelin M.R., Schulz H. Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease. *Eur. Respir. J.* 2014; 43 (4): 983–992. DOI: 10.1183/09031936.00046213.
3. Birch J., Anderson R.K., Correia-Melo C., Jurk D., Hewitt G., Marques F.M., Green N.J., Moisey E., Birrell M.A., Belvisi M.G., Black F., Taylor J.J., Fisher A.J., De Soyza A., Passos J.F. DNA damage response at telomeres contributes to lung aging and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2015; 309 (10): L1124–L1137. DOI: 10.1152/ajplung.00293.2015.
4. Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., Dani M., Deaven L.L., Jones M.D., Meyne J., Ratliff R.L., Wu J.R. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85 (18): 6622–6626. DOI: 10.1073/pnas.85.18.6622.
5. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid strains. *Exp. Cell Res.* 1965; 37 (3): 614–636. DOI: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
6. Rufer N., Brümmendorf T.H., Kolvraa S., Bischoff C., Christensen K., Wadsworth L., Schulzer M., Lansdorp P.M. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J. Exp. Med.* 1999; 190 (2): 157–167. DOI: 10.1084/jem.190.2.157.
7. Weng N., Levine B.L., June C.H., Hodes R.J. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92 (24): 11091–11094. DOI: 10.1073/pnas.92.24.11091.
8. Burns J.B., Lobo S.T., Bartholomew B.D. In vivo reduction of telomere length in human antigen-reactive memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30 (7): 1894–1901. DOI: 10.1002/1521-4141(200007)30:7<1894::AID-IMMU1894>3.0.CO;2-N.
9. Andrews N.P., Fujii H., Goronzy J.J., Weyand C.M. Telomeres and immunological diseases of aging. *Gerontology.* 2010; 56 (4): 390–403. DOI: 10.1159/000268620.

10. Schönland S.O., Lopez C., Widmann T., Zimmer J., Bryl E., Goronzy J.J., Weyand C.M. Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages. *PNAS*. 2003; 100 (23): 13471–13476. DOI: 10.1073/pnas.2233561100.
11. Борисов В.И., Демаков С.А., Непомнящих В.М., Леонова М.И., Баровская Н.А., Кожевников В.С. Сокращение теломерных районов ДНК в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов при заболеваниях атопической природы. *Омский научный вестник*. 2007; 3 (61): 172–174. [Borisov V.I., Demakov S.A., Nepomnyaschikh V.M., Leonova M.I., Barovskaya N.A., Kozhevnikov V.S. Decreasing of DNA telomere regions in subpopulations of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in atopic diseases. *Omsk Scientific Bulletin*. 2007; 3 (61): 172–174 (in Russ.)].
12. Борисов В.И., Демаков С.А., Непомнящих В.М., Леонова М.И., Демина Д.В., Баровская Н.А., Кожевников В.С. Особенности изменения средней длины теломер в лимфоцитах у больных бронхиальной астмой. *Медицинская иммунология*. 2009; 11 (6): 523–530. [Borisov V.I., Demakov S.A., Nepomnyaschikh V.M., Leonova M.I., Demina D.V., Barovskaya N.A., Kozhevnikov V.S. Some features of changing telomere length in lymphocytes from the patients with bronchial asthma. *Medical Immunology*. 2009; 11 (6): 523–530 (in Russ.)].
13. Kyoh S., Venkatesan N., Poon A.H., Nishioka M., Lin T., Bagloli C.J., Eidelman D.H., Hamid Q. Are leukocytes in asthmatic patients aging faster? A study of telomere length and disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 132 (2): 480–482. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.02.010.
14. Belsky D.W., Shalev I., Sears M.R., Hancox R.J., Lee Harrington H., Houts R., Moffitt T.E., Sugden K., Williams B., Poulton R., Caspi A. Is chronic asthma associated with shorter leukocyte telomere length at midlife? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014; 190 (4): 384–391. DOI: 10.1164/rccm.201402-0370OC.
15. Lansdorp P.M., Verwoerd N.P., van de Rijke F.M., Dragowska V., Little M.T., Dirks R.W., Raap A.K., Tanke H.J. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5 (5): 685–691. DOI: 10.1093/hmg/5.5.685.
16. Graakjaer J.J., Der-Sarkissian H., Schmitz A., Bayer J., Kolvraa G.T.S., Londono-Vallejo J.A. Allele-specific relative telomere lengths are inherited. *Hum. Genet.* 2006; 119 (3): 344–350. DOI: 10.1007/s00439-006-0137-x.
17. Xing J., Ajani J.A., Chen M., Izzo J., Lin J., Chen Z., Gu J., Wuet X. Constitutive short telomere length of chromosome 17p and 12q but not 11q and 2p are associated with an increased risk for esophageal cancer. *Cancer Prev. Res.* 2009; 2 (5): 459–465. DOI: 10.1158/1940-6207.
18. Zheng Y.L., Zhou X., Loffredo C.A., Shields P.G., Sun B. Telomere deficiencies on chromosomes 9p, 15p, 15q and Xp: potential biomarkers for breast cancer risk. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 20 (2): 378–386. DOI: 10.1093/hmg/ddq461.
19. Blinova E.A., Zinnatova E.V., Barkovskaya M.Sh., Borisov V.I., Sizikov A.E., Kozhevnikov V.S., Rubtsov N.B., Kozlov V.A. Telomere length of individual chromosomes in patients with rheumatoid arthritis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016; 160 (6): 779–782. DOI: 10.1007/s10517-016-3308-3.
20. Bangs C.D., Donlon T.A. Metaphase chromosome preparation from cultured peripheral blood cells. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2005; 45 (1): 4.1.1–4.1.19. DOI: 10.1002/0471142905.hg0401s45.
21. Barkovskaya M.Sh., Bogomolov A.G., Knauer N.Yu., Rubtsov N.B., Kozlov V.A. Development of software and modification of Q-FISH protocol for estimation of individual telomere length in immunopathology. *JBCB*. 2017; 15 (2): 1650041. DOI: 10.1142/s0219720016500414.
22. Costenbader K.H., Prescott J., Zee R.Y., DeVivo I. Immunosenescence and rheumatoid arthritis: does telomere shortening predict impending disease? *Autoimmun. Rev.* 2011; 10 (9): 569–573. DOI: 10.1016/j.autrev.2011.04.034.
23. Kaul Z., Cesare A.J., Huschtscha L.I., Neumann A.A., Reddel R.R. Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells. *EMBO Rep.* 2011; 13 (1): 52–59. DOI: 10.1038/embor.2011.227.
24. Baur J.A., Zou Y., Shay J.W., Wright W.E. Telomere position effect in human cells. *Science*. 2001; 292 (5524): 2075–2077. DOI: 10.1126/science.1062329.
25. Lou Z., Jun W., Riethman H., Baur J.A., Voglauer R., Shay J.W., Wright W.E. Telomere length regulates ISG15 expression in human cells. *Aging*. 2009; 1 (7): 608–621. DOI: 10.18632/aging.100066.
26. Stadler G., Rahimov F., King O.D., Chen J., Robin J.D., Wagner K.R., Shay J.W., Emerson C.P., Wright W.E. Telomere position effect regulates DUX4 in human facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013; 20 (6): 671–678. DOI: 10.1038/nsmb.2571.
27. Robin J.D., Ludlow A.T., Chen M., Magdinier F., Batten K., Holohan B., Stadler G., Wagner K.R., Shay J.W., Wright W.E. Telomere position effect: regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances. *Genes Dev.* 2014; 28 (22): 2464–2476. DOI: 10.1101/gad.251041.114.
28. Hakonarson H., Halapi E. Genetic analyses in asthma: current concepts and future directions. *Am. J. Pharmacogenomics*. 2002; 2 (3): 155–166. DOI: 10.2165/00129785-200202030-00001.
29. Bonser L.R., Erle D.J. Airway mucus and asthma: the role of MUC5AC and MUC5B. *J. Clin. Med.* 2017; 6 (12): 112. DOI: 10.3390/jcm6120112.
30. Njajou O.T., Cawthon R.M., Damcott C.M., Wu S.H., Ott S., Garant M.J., Blackburn E.H., Mitchel B.D., Shuldiner A.R., Hsueh W.C. Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan.

- PNAS. 2007; 104 (29): 12135–12139. DOI: 10.1073/pnas.0702703104.
31. Broer L., Codd V., Nyholt D.R., Deelen J., Mangino M., Willemsen G., Albrecht E., Amin N., Beekman M., de Geus E.J.C., Henders A., Nelson C.P., Steves C.J., Wright M.J., de Craen A.J.M., Isaacs A., Matthews M., Moayyeri A., Montgomery G.W., Oostra B.A., Vink J.M., Spector T.D., Slagboom P.E., Martin N.G., Samani N.J., van Duijn C.M., Boomsma D.I. Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013; 21 (10): 1163–1168. DOI: 10.1038/ejhg.2012.303.
 32. Colmegna I., Diaz-Borjon A., Fujii H., Schaefer L., Goronzy J.J., Weyand C.M. Defective proliferative capacity and accelerated telomeric loss of hematopoietic progenitor cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58 (4): 990–1000. DOI: 10.1002/art.23287.
 33. Martens U.M., Zijlmans J.M., Poon S.S., Dragowska W., Yui J., Chavez E.A., Ward R.K., Lansdorp P.M. Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat. Genet.* 1998; 18 (1): 76–80. DOI: 10.1038/ng0198-018.
 34. Morrish T.A., Greider C.W. Short telomeres initiate telomere recombination in primary and tumor cells. *PLoS Genet.* 2009; 5 (1): 1–15. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000357.
 35. Pickett H.A., Henson J.D., Au A.Y., Neumann A.A., Reddel R.R. Normal mammalian cells negatively regulate telomere length by telomere trimming. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20 (23): 46844692. DOI: 10.1093/hmg/ddr402.
 36. Zhdanova N.S., Rubtsov N.B. Telomere recombination in normal mammalian cells. *Russian Journal of Genetics.* 2016; 52 (1): 8–16. DOI: 10.1134/S1022795416010142.

Вклад авторов

Барковская М.Ш. – проведение исследования, обработка результатов и анализ данных, подготовка статьи. Блинова Е.А. – участие в интерпретации данных, подготовка статьи. Коняхина Ю.А. – помощь в наборе клинического материала. Леонова М.И. – ведение и отбор пациентов для исследования согласно критериям. Непомнящих В.М. – ведение и отбор пациентов для исследования согласно критериям. Демина Д.В. – ведение и отбор пациентов для исследования согласно критериям. Кожевников В.С. – разработка концепции исследования. Козлов В.А. – обоснование рукописи, окончательное утверждение для публикации.

Authors contribution

Barkovskaya M.Sh. – carrying out of the research, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript. Blinova E.A. – interpretation of data, drafting of the manuscript. Konyahina J.V. – assistance in obtaining clinical material. Leonova M.I. – selection and management of patients according to the criteria. Nepomniashchikh V.M. – selection and management of patients according to the criteria. Demina D.V. – selection and management of patients according to the criteria. Kozhevnikov V.S. – conception. Kozlov V.A. – justification of the manuscript and final approval of the manuscript for publication.

Сведения об авторах

Барковская Маргарита Шамилевна, мл. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0001-5748-9116.

Блинова Елена Андреевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-3327-3630.

Коняхина Юлия Владимировна, клинический ординатор, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Леонова Марина Ивановна, врач аллерголог-иммунолог, отделение аллергологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Непомнящих Вера Макаровна, врач аллерголог-иммунолог, отделение аллергологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Демина Дарья Владимировна, канд. мед. наук, врач аллерголог-иммунолог, зав. отделением аллергологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Authors information

Barkovskaya Margarita Sh., Junior Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5748-9116.

Blinova Elena A., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3327-3630.

Konyahina Julia V., Resident Physician, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Leonova Marina I., Allergist-immunologist, Department of Allergy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Nepomniashchikh Vera M., Allergist-immunologist, Department of Allergy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Demina Darja V., PhD, Allergist-immunologist, Head of the Department of Allergy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Kozhevnikov Vladimir S., DM, Professor, Chief Researcher of Laboratory of Clinical Immunopathology,

Кожевников Владимир Сергеевич, д-р. мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Козлов Владимир Александрович, д-р. мед. наук, профессор, академик РАН, науч. руководитель НИИФКИ, зав. лабораторией клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

(✉) **Барковская Маргарита Шамилевна**, e-mail: margaritabarkovskaya@gmail.com.

RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Kozlov Vladimir A., DM, Professor, Academician of RAS, Scientific Supervisor of RIFCI, Head of the Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

(✉) **Barkovskaya Margarita Sh.**, e-mail: margaritabarkovskaya@gmail.com.

Received 22.11.2018

Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 22.11.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Особенности клеточного иммунитета и регенерации при алкогольном фиброзе печени

Газатова Н.Д.¹, Юрова К.А.¹, Гаврилов Д.В.², Вульф М.А.¹,
Новицкий В.В.³, Тодосенко Н.М.¹, Литвинова Л.С.¹

¹ Балтийский федеральный университет (БФУ) им. И. Канта
Россия, 236029, г. Калининград, ул. Гайдара, 6

² Наркологический диспансер Калининградской области
Россия, 236006, г. Калининград, ул. Барнаульская, 6а

³ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных алкогольным фиброзом печени (АФП).

Материалы и методы. В исследование были включены 62 больных АФП; 15 пациентов, злоупотребляющих алкоголем, без фиброза печени и 20 условно здоровых доноров. В образцах лизированной периферической крови методом проточной цитометрии определяли число клеток, несущих поверхностные маркеры.

Результаты. У больных АФП на терминальных стадиях (ст.) фиброза регистрировалась значительная лимфопения с изменением состава основных субпопуляций лимфоцитов относительно значений условно здоровых доноров и группы сравнения. Выявленное нами в крови больных АФП с терминальными (III–IV) ст. заболевания снижение (относительно контроля и группы сравнения) относительного числа наивных (T_N) и Т-лимфоцитов центральной памяти (T_{CM}), ассоциированное с ростом количества эффекторных клеток (T_{EM} и T_{EMRA}), позволяет нам предположить у этой категории больных факт прямой дифференцировки лимфоцитов T_N и T_{CM} в эффекторные (T_{EM} и T_{EMRA}), что может усугублять течение тканедеструктивного процесса за счет высокой биоцидной активности последних. Повышенный уровень гемопоэтических (CD34 и CD133) клеток в периферической крови на начальных и умеренных (I–II) ст. фиброза (относительно контроля и группы сравнения) может быть обусловлен персистирующим воспалением в паренхиме печени и нарастающим дисбалансом между процессами ее повреждения и репаративными возможностями. Тогда как снижение их количества на терминальных ст. фиброза может свидетельствовать о нарастающей декомпенсации и истощении регенераторного потенциала организма на финальных этапах дегенеративного процесса.

Заключение. В целом полученные данные демонстрируют новые аспекты иммунной регуляции процессов фиброгенеза при хроническом алкоголизме.

Ключевые слова: хронический алкоголизм, цирроз печени, алкоголь, субпопуляционный состав лимфоцитов.

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

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках субсидии, выделенной на реализацию Программы повышения конкурентоспособности и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» БФУ им. И. Канта.

✉ Литвинова Лариса Сергеевна, e-mail: larisalitvinova@yandex.ru.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом БФУ им. И. Канта (протокол № 25 от 26.12.2017).

Для цитирования: Газатова Н.Д., Юрова К.А., Гаврилов Д.В., Вульф М.А., Новицкий В.В., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С. Особенности клеточного иммунитета и регенерации при алкогольном фиброзе печени. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 175–189. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-175-189>.

УДК 616.36-004.4-092.19:577.27

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-175-189>

Features of cellular immunity and regeneration for alcoholic fibrosis of the liver

Gazatova N.D.¹, Yurova K.A.¹, Gavrilov D.V.², Vulf M.A.¹, Novitskiy V.V.³, Todosenko N.M.¹, Litvinova L.S.¹

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University (IKFU)
6, Gaidar Str., 236029, Kaliningrad, Russian Federation

² Drug Dispensary Kaliningrad Region (DDKG)
6a, Barnaulskaya Str., 236006, Kaliningrad, Russian Federation

³ Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moscow Trakt, 634050, Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

Purpose. The subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes was evaluated in patients with alcoholic liver fibrosis (ALF).

Materials and methods. The study included 62 patients with ALF; 15 patients abusing alcohol without liver fibrosis and 20 conditionally healthy donors. In samples of lysed peripheral blood, the number of cells bearing surface markers was determined by flow cytometry. In patients with ALF at terminal stages of fibrosis, significant lymphopenia was recorded with a change in the composition of the main subpopulations of lymphocytes relative to the values of conditionally healthy donors and the comparison group.

Results. We identified in the blood of ALF patients with terminal (III–IV) stage (relative to control and comparison group) of the relative number of naive (T_N) and central memory T-lymphocytes (T_{CM}) associated with an increase in the number of effector cells (T_{EM} and T_{EMRA}) allows us to suggest in this category of patients the direct differentiation of T_N and T_{CM} lymphocytes to effector (T_{EM} and T_{EMRA}), which can aggravate the course of the tissue-destructive process due to the high biocidal activity of the latter. Elevated levels of hematopoietic (CD34 and CD133) cells in the peripheral blood at the initial and moderate stages. (I–II) fibrosis (relative to control and comparison group) may be due to persistent inflammation in the liver parenchyma and an increasing imbalance between the processes of its damage and reparative capabilities. Whereas the decrease in their number at the terminal station fibrosis may indicate an increasing decompensation and depletion of the regenerative potential of the organism in the final stages of the degenerative process.

Conclusions. In general, the obtained data demonstrate new aspects of the immune regulation of the processes of fibrogenesis in chronic alcoholism.

Key words: alcoholic liver fibrosis, chronic alcoholism, liver cirrhosis, cellular immunity, alcohol, subpopulation composition of lymphocytes.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out due to the aim grant allocated for the implementation of the Competitiveness Enhancement Program and the grant “Organization of scientific research 20.4986.2017 / BY” of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee under IKFU (Protocol No. 25 of 26.12.2017).

For citation: Gazatova N.D., Yurova K.A., Gavrilov D.V., Vulf M.A., Novitskiy V.V., Todosenko N.M., Litvinova L.S. Features of cellular immunity and regeneration for alcoholic fibrosis of the liver. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 175–189. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-175-189>.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема хронических диффузных заболеваний печени, включая стеатоз, фиброз и цирроз, относится к приоритетам национальных систем здравоохранения индустриально развитых стран мира [1, 2]. Преобладающим этиологическим фактором в патогенезе хронических заболеваний печени является длительное употребление алкоголя [2, 3]. Цикличность процессов повреждения и репарации гепатоцитов при фиброгенезе, индуцированного большинством гепатотоксических факторов, ассоциируют с дизрегуляцией дистантных и локальных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета [4].

Согласно современным представлениям, печень в условиях физиологической нормы рассматривается в качестве иммунного органа, обогащенного клетками врожденного (клетки Купфера, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, натуральные киллеры (NK, natural killer), Т-клетки натуральные киллеры (NKT, включая инвариантные iNKT-клетки) и др.) и адаптивного (популяции $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, В-лимфоциты) иммунитета. Характеризуется сложной и активной цитокиновой средой, включающей экспрессию основных провоспалительных (интерлейкина (IL) 2, IL-7, IL-12, IL-15, интерферона (IFN) γ и др.) и противовоспалительных (IL-10, IL-13 и трансформирующего фактора роста (TGF) β) медиаторов резидентными клетками [4]. В то же время для предотвращения чрезмерной активации печень поддерживает статус иммунной толерантности [4].

Хроническое злоупотребление алкоголем модулирует морфофункциональное состояние всех популяций иммунных клеток [4]. В частности, этанол опосредует гиперактивацию клеток врожденного иммунитета как в периферической крови, так и в тканях печени за счет бактериальных токсинов, проникающих в избыточных количествах в системную циркуляцию, вследствие повышенной проницаемости кишечной стенки и сниженной функции печени [3]. Высокий уровень

продукции этими клетками активных форм кислорода и целого спектра молекул с провоспалительным действием стимулирует трансформацию резидентных звездчатых клеток печени (ЗКП, клетки Ито) в миофибробласты, продуцирующие компоненты внеклеточного матрикса с последующим их накоплением в пространстве Диссе, а также способствует миграции иммунных клеток из кровотока в очаг повреждения, приводя к усилению инфильтративного компонента воспаления, усугубляя, тем самым, повреждение паренхимы печени [5]. В то же время длительный прием алкоголя способствует развитию лимфопении, с увеличением числа активированных Т-клеток в циркуляции, опосредованной их гомеостатической пролиферацией [5, 6].

Учитывая тот факт, что механизмы этанолиндуцированного фиброгенеза до конца не расшифрованы, интерес к оценке состояния клеточного звена врожденного и адаптивного иммунитета у больных алкогольной болезнью печени (АБП) продиктован участием иммунных клеток в регуляции воспалительных и регенеративных реакций, возникающих в ответ на повреждение гепатоцитов, и, в конечном итоге, их ролью в модуляции печеночного фиброгенеза. В настоящей работе была проведена оценка параметров клеточного иммунитета и регенерации у пациентов с алкогольным фиброзом печени, ранжированных по стадиям (ст.) процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служила периферическая кровь, взятая из локтевой вены утром натощак с помощью стандартных вакуумных систем BD VACUTAINER™ (Greiner-bio-one, Австрия) с гепарином (20 Ед/мл) у 62 больных алкогольным фиброзом печени (АФП, МКБ 10 – K70.2; 32 женщины и 30 мужчин в возрасте $(46,4 \pm 5,6)$ лет), 15 пациентов, злоупотребляющих алкоголем без нарушенной функции печени (8 женщин и 7 мужчин в возрасте $(42,1 \pm 4,2)$ лет) и 20 условно здоровых доноров (10 женщин и 10 мужчин

в возрасте ($38,3 \pm 6,4$) лет). Пациенты с АФП были ранжированы на четыре группы в зависимости от ст. фибротического процесса (по шкале

METAVIR, I ст. – 17 человек, II ст. – 16 человек, III ст. – 17 человек, IV (цирроз) ст. – 12 человек (табл. 1).

Т а б л и ц а 1
T a b l e 1

Распределение больных алкогольным фиброзом печени (АФП) по стадиям Distribution of patients with alcoholic liver fibrosis (ALF) by stages						
Показатель Characteristic	Стадия Stage				Условно здоровые доноры Conditionally healthy donors	Без АФП Without ALF
Стадия фиброза по METAVIR Stage of fibrosis according to METAVIR	I	II	III	IV		
Количество пациентов, <i>n</i> Number of patients, <i>n</i>	17	16	17	12	20	15
Возраст, лет Age (years)	$43,5 \pm 3,28$	$46,92 \pm 5,39$	$44,39 \pm 5,33$	$42,91 \pm 6,03$	$38,3 \pm 6,4$	$42,1 \pm 4,2$
Мужчины/женщины Male/Female	8/9	8/8	9/8	6/6	10/10	7/8

Пациенты с АФП и без нарушений структуры и функций печени, вошедшие в исследование, имели в анамнезе хроническое злоупотребление алкоголем и характеризовались как сильно пьющие (4 200–5 600 г 100%-го этанола в месяц), со стажем употребления алкоголя не менее 3 и не более 10 лет. Для исключения прямого действия этанола на исследуемые параметры взятие крови производили на 7-е сут после детоксикационной терапии в условиях стационара.

Верификация диагноза и набор пациентов в группы исследования осуществлялись заведующим наркологическим отделением, врачом психиатром-наркологом Д.В. Гавриловым на базе ГБУЗ «Наркологический диспансер Калининградской области» (гл. врач – Ю.Н. Скалин), а также заведующим диагностическим отделением, врачом ультразвуковой диагностики высшей квалификационной категории Н.Б. Котовым на базе клинко-диагностического центра ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта» (гл. врач – О.В. Иванова). Диагностические исследования включали опрос пациентов, полигепатографию, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, фиброэластометрию печеночной паренхимы, биохимический анализ крови.

Подготовка проб для проведения иммунофенотипического анализа в образцах цельной венозной крови была осуществлена по методике «Окрашивание – лизис». Образцы цельной венозной крови в объеме 10 мкл были инкубированы при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 мин с 10 мкл различных коктейлей моноклональных антител, приготовленных *ex tempore*, в иммунологических планшетах. Далее для лизирования эритроцитов в образцах использовали реагент Guava 1X Lysing Solution

(Merck Millipore, Германия) в соответствии с протоколом производителя.

В образцах лизированной периферической крови число клеток, несущих поверхностные маркеры (CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD62L, CD45R0, CD34, CD133), определяли методом проточной лазерной цитометрии с помощью коктейля моноклональных антител, конъюгированных с Viablue (CD45); аллофикоцианином (APC) (CD19, CD62L); флуоресцинизиотинотом (FITC) (CD4, CD34, CD16, CD45R0), фикоэритрином (PE) (CD8, CD56, CD133); с конъюгатом PE с цианином (PE-Cy7) (CD3), согласно протоколам производителей (Miltenyi Biotec, Германия; Abcam, Cambridge, Великобритания; e-Bioscience, США). Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлуориметре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия).

Коктейли использованных моноклональных антител: CD45-Viablue, CD3-PE.Cy7, CD4-FITC, CD8-PE; CD45-Viablue, CD3-PE.Cy7, CD16-FITC, CD56-PE, CD19-APC, CD45-Viablue, CD3-PE.Cy7, CD45RO-FITC, CD62L-APC; CD45-Viablue, CD34-FITC, CD133-PE. Все результаты цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез [7]. При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения Колмогорова – Смирнова. Для нормально распределенных выборок вычисляли средние выбо-

рочные характеристики: среднее арифметическое $\bar{X}$, ошибку среднего m ; для выборок, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану, первый и третий квартили $Me (Q_1-Q_3)$. Для оценки достоверности различий выборок использовали параметрический t -критерий Стьюдента или непараметрический Манна – Уитни для независимых выборок. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена r) и регрессионный (с вычислением коэффициента регрессии r^2) анализы. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [7]. При проведении сравнительного анализа изучаемых показателей клеточного иммунитета и регенерации в группе условно здоровых доноров, у лиц с хроническим злоупотреблением алкоголя с и без фиброза печени в зависимости от гендерных критериев достоверных различий тестируемых параметров не выявлено. Ввиду отсутствия значимых различий между исследуемыми показателями клеточного иммунитета и регенерации у больных АФП с I и II ст. фиброза они были объединены в одну группу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Употребление этанола, даже умеренное, изменяет врожденные и адаптивные иммунные реакции, выявляя специфические нарушения в зависимости от длительности и интенсивности приема (острое, хроническое) и наличия или отсутствия АБП [8]. Провоспалительные реакции, развивающиеся вследствие длительного приема алкоголя, играют важную роль в патогенезе АБП [9]. В целом эффекты алкоголя на иммунитет, особенно при его хроническом употреблении, опосредуют развитие субклинической иммуносупрессии, которая становится клинически значимой только после вторичной компроментации (бактериальная, вирусная инфекции, декомпенсационная фаза повреждения ткани и т.д.) [10].

У обследованных нами больных АФП с III ст., злоупотребляющих алкоголем, регистрировалось значимое снижение относительного, а у больных циррозом (IV ст.) печени абсолютного и относительного числа лимфоцитов содержания $CD45^+CD3^+$ и $CD45^+CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови в сравнении с контролем и группой хронических алкоголиков без АБП (табл. 2).

Т а б л и ц а 2
Table 2

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у больных алкогольным фиброзом (АФП) печени, ранжированных по стадиям					
Subpopulation of peripheral blood lymphocytes in patients with alcoholic liver fibrosis (ALF) ranked by stages					
Показатель Characteristic	Обследованные Examined				
	Здоровые доноры $n = 20$ Healthy donors $n = 20$	Без АФП $n = 15$ Without ALF $n = 15$	I–II ст. $n = 33$ I–II stages $n = 33$	III ст. $n = 17$ III stage $n = 17$	IV ст. $n = 12$ IV stage $n = 12$
	I	II	III	IV	V
Общее количество лейкоцитов, $10^9/\text{л}$, $\bar{X} \pm m$ Total leucocyte count, $10^9/\text{л}$, $\bar{X} \pm m$	$5,79 \pm 0,78$	$5,83 \pm 0,67$	$5,96 \pm 0,35$	$6,29 \pm 1,16$	$6,55 \pm 1,85$
$CD45^+$, $10\%/\text{л}$, $CD45^+$, 10%	$2,81 \pm 0,13$	$2,69 \pm 0,24$	$2,74 \pm 0,15$	$2,69 \pm 0,31$	$1,55 \pm 0,53$ $p_0 = 0,011$ $p_1 = 0,016$ $p_2 = 0,029$ $p_3 = 0,041$
$CD45^+$, %, $Me (Q_1-Q_3)$	36,63 (34,59–38,91)	34,22 (33,20–37,54)	36,43 (35,11–37,92)	30,91 (29,10–34,32) $p_0 = 0,015$ $p_1 = 0,021$ $p_2 = 0,034$	26,11 (25,49–27,91) $p_0 = 0,045$ $p_1 = 0,024$ $p_2 = 0,031$ $p_3 = 0,047$
$CD45^+CD3^+$, $10\%/\text{л}$, $\bar{X} \pm m$ $CD45^+CD3^+$, 10% , $\bar{X} \pm m$	$1,85 \pm 0,41$	$1,76 \pm 0,32$	$1,85 \pm 0,61$	$1,78 \pm 0,24$	$1,24 \pm 0,31$ $p_0 = 0,028$ $p_1 = 0,025$ $p_2 = 0,039$ $p_3 = 0,021$

Продолжение табл. 2

End of table 2

Показатель Characteristic	Обследованные Examined				
	Здоровые доноры $n = 20$ Healthy donors $n = 20$	Без АФП $n = 15$ Without ALF $n = 15$	I–II ст. $n = 33$ I–II stages $n = 33$	III ст. $n = 17$ III stage $n = 17$	IV ст. $n = 12$ IV stage $n = 12$
	I	II	III	IV	V
CD45 ⁺ CD3 ⁺ , %, $Me (Q_1-Q_3)$	77,43 (72,56–78,87)	74,12 (70,21–76,38)	75,08 (72,34–77,34)	63,01 (62,12–66,37) $p_0 = 0,026$ $p_1 = 0,038$ $p_2 = 0,024$	61,92 (59,17–62,96) $p_0 = 0,034$ $p_1 = 0,019$ $p_2 = 0,042$ $p_3 = 0,038$
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10% λ , $X \pm m$ CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10% λ , $X \pm m$	0,94 $\pm$ 0,14	0,83 $\pm$ 0,11	0,87 $\pm$ 0,12	0,88 $\pm$ 0,09	0,58 $\pm$ 0,02 $p_0 = 0,045$ $p_1 = 0,034$ $p_2 = 0,031$ $p_3 = 0,048$
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %, $Me (Q_1-Q_3)$	48,62 (43,11–48,98)	45,38 (42,98–47,38)	46,81 (46,20–49,01)	43,09 (36,29–44,29) $p_0 = 0,032$ $p_1 = 0,016$ $p_2 = 0,045$	38,72 (32,39–39,24) $p_0 = 0,020$ $p_1 = 0,017$ $p_2 = 0,031$ $p_3 = 0,023$
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10% λ , $Me (Q_1-Q_3)$ CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10% λ , $Me (Q_1-Q_3)$	0,78 (0,76–0,83)	0,75 (0,73–0,79)	0,82 (0,79–0,84)	0,65 (0,63–0,68) $p_0 = 0,039$ $p_1 = 0,041$ $p_2 = 0,046$	0,54 (0,51–0,56) $p_0 = 0,045$ $p_1 = 0,027$ $p_2 = 0,034$ $p_3 = 0,048$
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %, $Me (Q_1-Q_3)$	29,91 (26,49–31,12)	30,01 (29,19–32,10)	32,35 (31,93–36,29) $p_0 = 0,021$ $p_1 = 0,044$	21,39 (20,32–23,49) $p_0 = 0,028$ $p_1 = 0,030$ $p_2 = 0,017$	20,42 (18,39–24,21) $p_0 = 0,032$ $p_1 = 0,021$ $p_2 = 0,042$
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺ , 10% λ , $X \pm m$ CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺ , 10% λ , $X \pm m$	0,43 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,8	0,44 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,11	0,34 $\pm$ 0,05 $p_0 = 0,019$ $p_1 = 0,026$ $p_2 = 0,031$ $p_3 = 0,023$
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺ , %, $Me (Q_1-Q_3)$	15,72 (14,39–16,01)	14,73 (14,55–15,78)	16,02 (15,98–16,91)	12,43 (9,92–13,01)	11,09 (7,21–11,98) $p_0 = 0,034$ $p_1 = 0,045$ $p_2 = 0,037$
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10% λ , $X \pm m$ CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10% λ , $X \pm m$	0,24 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,08
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %, $Me (Q_1-Q_3)$	10,21 (8,22–11,11)	15,01 (14,09–17,72) $p_0 = 0,038$	15,21 (14,23–17,37) $p_0 = 0,38$	8,04 (7,93–8,35) $p_0 = 0,034$ $p_1 = 0,029$ $p_2 = 0,047$	7,15 (6,91–7,76) $p_0 = 0,028$ $p_1 = 0,016$ $p_2 = 0,021$
Индекс иммунорегуляции (CD4/CD8), $Me (Q_1-Q_3)$ Immune regulation index (CD4/CD8), $Me (Q_1-Q_3)$	1,63 (1,58–1,72)	1,51 (1,49–1,59)	1,48 (1,44–1,52)	1,89 (1,71–1,92) $p_0 = 0,033$ $p_1 = 0,045$ $p_2 = 0,047$	1,91 (1,87–1,94) $p_0 = 0,015$ $p_1 = 0,023$ $p_2 = 0,046$

Примечание. Здесь и в табл. 3: p_0-p_3 – уровни значимости по сравнению с группами I–V соответственно.Note. Here and in table 3: p_0-p_3 – significance levels in comparison with groups I–V, respectively.

У больных АФП с I–II ст., напротив, наблюдалось незначительное увеличение исследуемых параметров (см. табл. 2). Установленная нами общая негативная корреляция ($r = -0,783$; $p = 0,031$) между относительным содержанием лимфоцитов и ст. фиброза у больных АФП находит отражение в исследованиях [11]. Более ранние работы L. Lombardo и соавт. свидетельствуют о взаимосвязи между уменьшением числа $CD3^+CD4^+$ и тяжестью течения цирроза печени [12].

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные роли лимфоцитов в патогенезе АБП, полученные результаты и их интерпретация являются крайне противоречивыми. Так, хроническое злоупотребление алкоголем у человека и в экспериментальных моделях (животные) способствует развитию лимфопении, нарушая баланс между различными субпопуляциями Т-клеток, а также оказывает влияние на их активацию и функциональный статус [10]. Группой авторов обнаружено, что у лиц, злоупотребляющих алкоголем без заболевания печени и у пациентов с алкогольным циррозом [13] значительная лимфопения опосредована равномерным уменьшением числа популяций $CD4$ и $CD8$ Т-лимфоцитов в циркуляции. Другие исследования, напротив, демонстрируют рост числа $CD3$ Т-клеток у хронических алкоголиков без АБП в основном за счет увеличения числа активированных цитотоксических лимфоцитов [14].

Лимфоциты $CD3^+CD8^+$ являются уникальной субпопуляцией [15], обладающей способностью модулировать свое окружение через секрецию различных медиаторов и прямую цитотоксичность [16]. Ранее было высказано предположение об участии $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов в повреждении печени. У обследованных нами пациентов с АФП на начальных и умеренных (I–II) ст. фиброза содержание (относительное) $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов было значительно выше соответствующих показателей здоровых доноров и лиц, не имеющих структурных и функциональных нарушений печени. Тогда как на более продвинутых стадиях заболевания регистрировалось значительное снижение абсолютного и относительного их содержания (см. табл. 2).

В некоторых работах было показано, что у человека и экспериментальных животных хроническое потребление этанола сопровождается увеличением числа и выраженной активацией популяций цитотоксических $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов, NK- и NKT-клеток [8, 14], что предполагает потенциальную роль эффекторных цитотоксических клеток в формировании фиброза печени через механизмы иммуноопосредованного апоптоза гепатоцитов [8].

В то же время, согласно данным литературы, на более продвинутых ст. фиброза у пациентов с циррозом печени и активным потреблением этанола число цитотоксических $CD4/CD8$ и NKT Т-клеток в циркуляции и их цитолитическая (цитотоксическая) активность *in vitro* снижаются наряду с повышенной продукцией у этой категории лиц факторов с профиброгенным действием IL-10 и TGF β [8]. Предполагают, что уменьшение числа пула цитотоксических клеток может быть обусловлено их усиленной миграцией в печень, что подтверждается присутствием активированных $CD4$ и $CD8$ Т-лимфоцитов в воспалительных печеночных инфильтратах при тяжелом фиброзе или циррозе алкогольной этиологии [2]. Эндотоксины (липополисахариды грамотрицательных бактерий), вырабатываемые кишечником, и продукты взаимодействия метаболитов этанола и клеточных структур, по-видимому, выступают в роли антигенов. В дополнение к вышесказанному, экспериментально было показано, что этанол дозозависимым образом индуцирует на $CD4$ и $CD8$ Т-лимфоцитах экспрессию хемокиновых рецепторов CXCR3 и CXCR4 (C-X-C motif chemokine receptor 3, 4), а также молекул адгезии на эндотелии сосудов, в частности сосудистого эндотелия 1-го типа (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) и межклеточной адгезии (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1), обеспечивая миграцию этих клеток в печень [17, 18]. Снижение числа цитотоксических Т-клеток в циркуляции на терминальных ст. фиброза (цирроза) может быть также опосредовано повышенной гибелью $CD8^+$ Т-клеток, индуцированной этанолом через митохондриальный путь апоптоза [19]. Кроме того, в литературе представлены сведения о фагоцитозе $CD8$ -лимфоцитов активированными ЗКП [20]. Следует отметить, что в условиях физиологической нормы высокое содержание активированных $CD8$ Т-клеток и $CD4/CD8$ Т-лимфоцитов памяти в печени связывают с механизмами утилизации этих клеток вследствие апоптотической гибели, индуцированной активацией антигеном [4].

Согласно полученным результатам, у больных АФП с III и IV ст. значения индекса иммунорегуляции (ИР) значимо превышали аналогичные показатели контроля, группы сравнения и лиц с АФП с меньшей стадией фиброза (см. табл. 2). Впервые лимфопения и увеличение ИР ($CD4/CD8$) у больных алкогольным циррозом с прогрессирующей печеночной недостаточностью были описаны Р. Couzigou и соавт. [21], что было подтверждено и более поздними работами [11, 20].

Интересно отметить противоположную зависимость у больных вирусными гепатитами (отрицательные корреляции между значениями ИР и стадией фиброза печени) [20].

Особый интерес в нашем исследовании представляла оценка числа Т-клеток, несущих маркеры наивных Т-клеток (T_N , $CD3^+CD62L^+CD45R0^{-/RA^+}$), Т-лимфоцитов центральной (T_{CM} , $CD3^+C-D62L^+CD45R0^+$) и эффекторной (T_{EM} , $CD3^+C-D62L^-CD45R0^+$) иммунной памяти, а также терминальнодифференцированных эффекторов, реэкспрессирующих высокомолекулярную изоформу рецептора CD45 – CD45RA (T_{EMRA} , $CD3^+C-D62L^-CD45R0^+$). Последние отличаются низкой теломеразной активностью, способностью продуцировать провоспалительные молекулы (в частности, фактор некроза опухолей (TNF) α), ростом экспрессии поверхностного маркера CD57, а также высоким внутриклеточным содержанием перфорина и гранзима А [21, 22]. Известно, что гетерогенные по фенотипическим, анатомическим и функциональным характеристикам субпопуляции Т-клеток памяти характеризуются антиген-

независимой персистенцией, самообновлением и способностью к самоподдержанию, обеспечивая быстрый и эффективный ответ при повторном воздействии патогенов инфекционной и неинфекционной природы [23]. Этанол – небольшая молекула, и не может быть использована в качестве антигена для индукции иммунной реакции. Однако, учитывая его дозозависимое супрессорное влияние на иммунитет, а также способность метаболита этанола ацетальдегида образовывать ковалентные химические аддукты с белками, липидами и ДНК [24], ранее была выдвинута гипотеза о влиянии хронического употребления алкоголя на изменение (увеличение) числа Т-клеток с фенотипом лимфоцитов памяти в циркуляции.

Согласно полученным нами данным, у всех больных АФП, ранжированных по стадиям фиброза, регистрировалось достоверное увеличение процентного числа эффекторных Т-клеток памяти T_{EM} , в том числе T_{EMRA} , на фоне снижения содержания популяций T_N и T_{CM} по сравнению с параметрами условно здоровых доноров и пациентов без АФП (рис.).

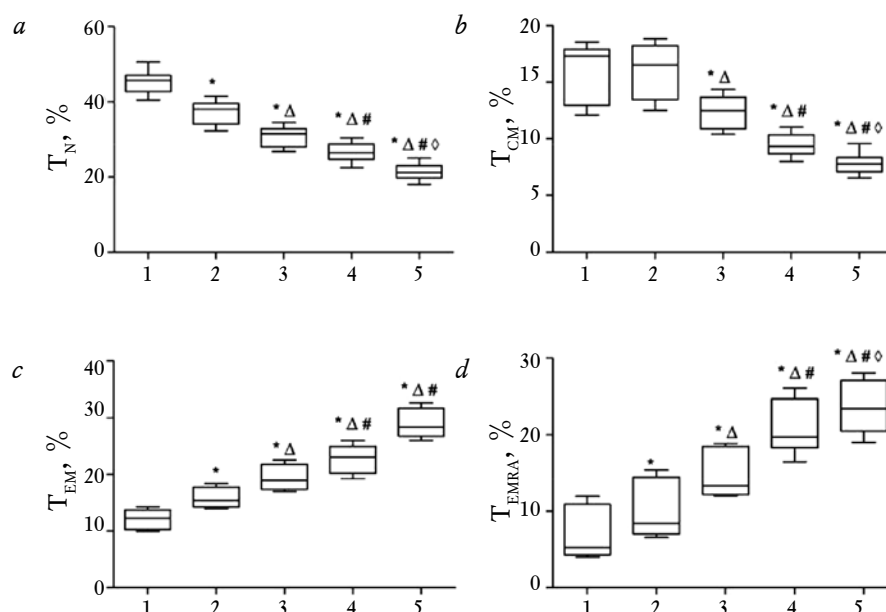


Рисунок. Содержание наивных Т-клеток (T_N)-А, Т-лимфоцитов центральной памяти (T_{CM})-Б, Т-клеток эффекторной памяти T_{EM} -В и терминально дифференцированных эффекторов (T_{EMRA})-Г в периферической крови больных алкогольным фиброзом печени, ранжированных по стадиям, %, $Me (Q_1-Q_3)$: 1 – здоровые доноры ($n = 20$); 2 – больные без АФП ($n = 15$); 3 – больные I–II ст. ($n = 33$); 4 – больные III ст. ($n = 17$); 5 – больные IV ст. ($n = 12$). Достоверность различий $p \leq 0,05$: * относительно здоровых доноров, Δ – относительно больных без АФП, # – относительно I–II ст., ◇ – относительно III ст.

Figure. Content of naive T cells (T_N)-A, T-lymphocytes of central memory (T_{CM})-B, T-cells of effector memory (T_{EM})-B and terminal differentiated effectors (T_{EMRA})-G in peripheral blood of patients with alcoholic liver fibrosis, ranked by stages, %, $Me (Q_1-Q_3)$: 1 – healthy donors, $n = 20$; 2 – patients without ALF, $n = 15$; 3 – patients (I–II stages), $n = 33$; 4 – patients (III stage), $n = 17$; 5 – patients (IV stage), $n = 12$. Reliability of differences $p \leq 0,05$: * compared with healthy donors, Δ – compared with patients without ALF, # – compared with I–II stages, ◇ – compared with III stage.

Следует отметить, что у категории больных без АФП число эффекторов T_{EM} и T_{EMRA} также превышало показатели контрольной группы, содержание T_{CM} лимфоцитов не изменялось (регистрировалась тенденция к снижению), а число наивных Т-лимфоцитов было значительно ниже нормы ($\approx 15\%$).

Влияние злоупотребления алкоголем на конверсию фенотипа наивных Т-лимфоцитов описано в литературе. Так, у взрослых мужчин, принимающих около 400 г этанола в день в течение примерно ($25,6 \pm 11,5$) лет, отмечалось сниженное число наивных (CD45RA) клеток в CD4/CD8 популяциях Т-лимфоцитов, тогда как число примированных (CD45RO) Т-клеток возрастало [5]. Аналогично в эксперименте на мышах (самцах и самках) хроническое потребление 20%-го этанола в питьевой воде в течение 6 мес уменьшало число наивных Т-клеток и увеличивало долю Т-клеток памяти в результате повышенной гомеостатической пролиферации последних, опосредованной лимфопенией [24].

В отличие от специфической антиген-зависимой активации Т-клеток, гомеостатическая пролиферация, опосредованная лимфопенией при хроническом потреблении алкоголя, индуцируется стимуляцией собственными пептидами, приводя к экспансии множественных клонов, что способствует увеличению риска развития аутоиммунных расстройств [23, 25]. В целом повышение содержания Т-клеток памяти связано с развитием хронических воспалительных заболеваний и возрастных патологий, таких как остеопороз, саркопения, болезнь Альцгеймера, аутоиммунные и онкологические заболевания, сердечно-сосудистая патология и др. [26, 27].

Обнаруженное нами снижение относительно числа лимфоцитов T_N и T_{CM} в крови больных АФП с терминальными ст. заболевания ассоциировалось с ростом количества эффекторных клеток T_{EM} и T_{EMRA} . Это позволяет нам предположить у этой категории больных факт прямой дифференцировки наивных Т-клеток и Т-лимфоцитов центральной памяти в эффекторные. Наше предположение подтверждается сильными корреляциями отрицательного характера между содержанием T_N с T_{EMRA} ($r = -0,863$; $p = 0,023$; $r = -0,773$; $p = 0,044$ для больных АФП с III и IV ст. фиброза) и T_{EM} ($r = -0,861$; $p = 0,038$ для больных АФП с IV ст. фиброза); T_{CM} с T_{EMRA} ($r = -0,731$; $p = 0,032$ для больных АФП с IV ст. фиброза) и T_{EM} (CD3⁺CD62L⁺CD45RO⁺) ($r = -0,891$; $p = 0,036$ для больных АФП с IV ст. фиброза). Результаты проведенного нами регрессионного анализа позволили продемонстрировать положи-

тельную зависимость содержания T_{EMRA} у больных АФП со ст. фиброза ($r^2 = 0,831$; $p = 0,028$) и отрицательную с числом наивных Т-клеток ($r^2 = -0,761$; $p = 0,042$). У лиц, злоупотребляющих алкоголем, без АБП также были обнаружены негативные ассоциации между числом T_N с T_{EM} ($r = -0,522$; $p = 0,015$) и T_{CM} с T_{EM} ($r = -0,691$; $p = 0,031$). Выявленная нами взаимосвязь между числом T_{EMRA} клеток и содержанием CD8⁺ Т-лимфоцитов у больных АФП с IV ст. фиброза ($r = 0,629$; $p = 0,041$) доказывает участие цитотоксических лимфоцитов в патогенезе АБП.

Таким образом, у лиц с хроническим активным злоупотреблением алкоголя на терминальных стадиях АФП снижение числа наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток центральной памяти сопровождается образованием Т-эффекторов (T_{EM} и T_{EMRA}) с высоким биоцидным потенциалом, что может усугублять течение тканедеструктивного процесса за счет экспрессии этими клетками молекул прямой цитотоксичности (гранзимы, перфорины) и продукции каскада медиаторов с провоспалительным действием. В то же время уменьшение пула наивных Т-клеток у данной категории больных может быть ассоциировано с нарушением формирования эффективных иммунных реакций на инфекцию и вакцинацию.

Важная роль в защите организма от многочисленных патогенов и опухолевых клеток принадлежит механизмам врожденного иммунитета, представленного, в том числе, системой интерферонов и натуральными киллерами [28]. В литературе описаны антифибротические эффекты НК-клеток *in vivo* и *in vitro*, запуск которых происходит при повреждении печени [20]. С одной стороны, следует отметить протекторную роль НК-клеток в патогенезе фиброза, вирусных гепатитов и опухолевых заболеваний печени, с другой – участие некоторых субпопуляций этих клеток (в частности, iNKT-клетки, несущие инвариантный Т-клеточный рецептор) в механизмах повреждения и воспалении печени не вызывает сомнения [28].

У пациентов с I–II ст. АФП относительное содержание НК-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) в периферической крови достоверно превышало значения условно здоровых доноров и было сопоставимым с результатами группы сравнения, тогда как у больных АФП с III–IV ст., напротив, регистрировалось снижение относительного числа CD3⁺CD16⁺CD56⁺ лимфоцитов (см. табл. 2).

В литературе существуют весьма разнонаправленные данные по влиянию этанола на НК-клетки. Некоторые авторы в эксперименте обнаружили способность алкоголя ингибировать цитолитиче-

скую функцию НК-клеток [29], тогда как другими группами были получены противоположные результаты [8]. Установлен интересный факт: снижение цитолитической активности натуральных киллеров при длительном воздействии этанола без патологии печени регистрируется на фоне повышения общей цитотоксичности, опосредованной другими клетками [8]. В то же время выявлено, что подавление функций НК-клеток печени при хроническом употреблении алкоголя способствует патогенезу АБП [30]. Уменьшение активности НК-клеток и их числа на периферии при АБП, возможно, связаны с избирательным хоумингом этих клеток в очаг воспаления в сочетании с этанолиндукцированным нарушением их продукции в костном мозге [30, 31].

Выявленные нами изменения пула естественных киллеров в циркуляции вполне согласуются с современной концепцией регрессии (разрешения) фиброза печени, основанной на запуске апоптоза активированных ЗКП, реализация которого может быть опосредована различными механизмами [28], где наиболее важным является активация НК-клеток интерферонами α , β и γ [32]. Учитывая, что $\approx 30\text{--}50\%$ лимфоцитов печени – НК-клетки, факт регуляции последними активности ЗКП представляется вполне логичным. Введение этанола в эксперименте значительно увеличивает резистентность ЗКП к апоптозу через угнетение активности НК-клеток и их способности продуцировать $\text{IFN}\gamma$ [30]. Показано, что хроническое потребление этанола ингибирует гибель активированных ЗКП, опосредованную НК-клетками, за счет подавления экспрессии активирующих рецепторов на НК-клетках, в частности NKG2D (natural killer group 2D), снижения синтеза апоптоз-индуцирующего лиганда семейства TNF (TNF -related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), гранзимов, перфорина и $\text{IFN}\gamma$ [33]. Кроме того, прием этанола стимулирует продукцию ЗКП $\text{TGF}\beta$; последний ингибирует функции НК-клеток [30].

Мы предполагаем, что уменьшение числа НК-клеток в периферической крови у хронических алкоголиков может способствовать снижению антифибротических эффектов этих клеток с утратой контроля над процессами фиброгенеза на терминальных ст. заболевания, индуцированного длительным приемом алкоголя. В-клетки в условиях физиологической нормы обеспечивают механизмы адаптивного (гуморального и клеточного) иммунитета за счет представления антигенов Т-клеткам, продукции специфических антител, секреции цитокинов и др. [34].

У обследованных нами лиц, страдающих хроническим алкоголизмом, на начальных и уме-

ренных ст. фиброза печени, содержание (относительное и абсолютное) В-клеток ($\text{CD}3^+\text{CD}19^+$) в периферической крови было сопоставимым с контрольными значениями и группой сравнения; тогда как на III ст. фиброза регистрировалось значимое снижение относительного, а у больных циррозом (IV ст.) относительного и абсолютного количества этих клеток относительно контроля и группы лиц без АБП (см. табл. 2).

Полученные нами результаты в целом не противоречат данным литературы, согласно которым у больных циррозом печени с активным статусом потребления алкоголя, уровень В-лимфоцитов в периферической крови значительно снижается [8, 11]. Аналогичные изменения выявлены также у хронических алкоголиков без патологии печени [35], что не подтвердилось в нашем исследовании. Предполагают, что регистрируемая при хроническом злоупотреблении алкоголя В-лимфопения опосредована влиянием этанола на развитие В-клеток в костном мозге на уровне ранних предшественников [35]. Экспериментально доказано, что воздействие *in vitro* этанола на поздней стадии дифференцировки олигоклональных неонатальных клеток-предшественниц приводит к нарушению дифференцировки В-клеток за счет этанол-индуцированного угнетения экспрессии транскрипционных факторов – раннего фактора В-клеток (early B-cell factor, EBF) и критичного фактора коммутирования В-линии (paired box, Pax 5) [35].

Исследования с использованием животных (мыши) также продемонстрировали важную роль В-лимфоцитов в развитии фиброза печени. Ученые установили, что участие В-клеток в прогрессии дегенеративных изменений в печени, индуцированных токсическими факторами, не зависит от Т-клеток и антителогенеза (антительных реакций), а определяются их функциями в месте локализации (секреция цитокинов, межклеточные взаимодействия и т.д.) [35]. Императивная роль В-клеток выявлена также в патогенезе аутоиммунного диабета у мышей NOD (non-obese diabetic) [36] и волчаночного нефрита в полигенных, *fas*-интактных и *fas*-дефицитных моделях системного аутоиммунитета у генетически модифицированных MRL (Murphy Roth Large) мышей [37]. В обоих случаях антителонезависимый механизм вовлечения В-клеток в патогенез этих заболеваний оказался преобладающим [38].

В литературе также встречаются отдельные работы, свидетельствующие, что в контексте общей лимфопении при хроническом алкоголизме повышается относительное содержание В-клеток, продуцирующих неспецифические иммуноглобу-

лины (Ig) М и А на фоне снижения секреции IgG, что предполагает потенциальную роль этих изменений в формировании аутоиммунных и иммунодефицитных состояний при АБП [8, 11]. Таким образом, снижение числа В-клеток в периферической крови мы констатировали только на терминальных ст. фиброза. У пациентов, злоупотребляющих алкоголем, на начальных ст. заболевания и без АБП изучаемые параметры были сопоставимы с контрольными, что может свидетельствовать об относительной резистентности В-клеток к действию алкоголя и запуске компенсаторных механизмов, обеспечивающих гуморальные реакции на ауто- или эндотоксины, образующиеся вследствие токсического действия метаболитов этанола и повышенной проницаемости кишечной стенки.

Выход из костного мозга в кровь полипотентных и унипотентных стволовых клеток (мобилизация стволовых клеток), обладающих высокой пролиферативной активностью и регенерационным потенциалом, и их миграция в поврежденные участки являются адаптивной реакцией организма, развивающейся в ответ на повреждение органов и тканей. Претенденты на стволовые гемопоэтические клетки (CD34,

CD133) как в составе первичной суспензии клеток фетальной печени, так и в изолированном виде обладают высокой колониеобразующей активностью и ярко выраженной способностью к мультинаправленной дифференцировке [39]. Определена способность циркулирующих стволовых клеток с фенотипом CD34⁺CD45⁻ дифференцироваться в эпителиальные клетки кожи и клетки желудочно-кишечного тракта и гепатоциты [40]. Широко обсуждается вопрос о способе дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток в гепатоциты, в частности за счет механизмов слияния и трансдифференцировки [39]. Согласно полученным нами результатам, содержание клеток CD45⁺CD34⁺/CD133⁺ в образцах периферической крови пациентов с АФП на начальных и умеренных ст. фиброза значительно превышало контрольные цифры в среднем в 2,5 раза, а также показатели группы сравнения ($\approx$ в 1,4 раза). У больных хроническим алкоголизмом с АФП на терминальных ст. фиброза число CD34 и CD133 позитивных клеток в образцах периферической крови значительно снижалось относительно результатов контроля и группы сравнения (табл. 3).

Т а б л и ц а 3
Table 3

Содержание гемопоэтических клеток (CD45⁺ CD34⁺ / CD133⁺) в периферической крови больных алкогольным фиброзом печени, ранжированных по стадиям, $Me (Q_1-Q_3)$

The content of hemopoietic cells (CD45⁺ CD34⁺ / CD133⁺) in the peripheral blood of patients with alcoholic liver fibrosis ranked by stages, $Me (Q_1-Q_3)$

Показатель Characteristic	Обследованные Examined				
	Здоровые доноры $n = 20$ Healthy donors $n = 20$	Без АФП $n = 15$ Without ALF $n = 15$	I–II ст. $n = 33$ I–II stages $n = 33$	III ст. $n = 17$ III stage $n = 17$	IV ст. $n = 12$ IV stage $n = 12$
	I	II	III	IV	V
CD45 ⁺ CD34 ⁺ , 10% CD45 ⁺ CD34 ⁺ , 10%	0,054 (0,041–0,061)	0,059 (0,046–0,062)	0,123 (0,101–1,145) $p_0 = 0,030$ $p_1 = 0,045$	0,033 (0,029–0,038) $p_0 = 0,021$ $p_1 = 0,035$ $p_2 = 0,043$	0,014 (0,005–0,021) $p_0 = 0,029$ $p_1 = 0,018$ $p_2 = 0,037$ $p_3 = 0,015$
CD45 ⁺ CD34 ⁺ , %	1,92 (1,85–1,98)	2,35 (1,41–2,62) $p_0 = 0,035$	4,45 (3,02–4,54) $p_0 = 0,041$ $p_1 = 0,025$	1,25 (1,18–1,35) $p_0 = 0,018$ $p_1 = 0,029$ $p_2 = 0,034$	0,91 (0,87–0,95) $p_0 = 0,025$ $p_1 = 0,048$ $p_2 = 0,031$ $p_3 = 0,044$
CD45 ⁺ CD133 ⁺ , 10% CD45 ⁺ CD133 ⁺ , 10%	0,035 (0,029–0,041)	0,049 (0,034–0,056) $p_0 = 0,451$	0,089 (0,076–0,101) $p_0 = 0,034$ $p_1 = 0,029$	0,032 (0,025–0,039) $p_0 = 0,021$ $p_1 = 0,045$ $p_2 = 0,048$	0,011 (0,005–0,019) $p_0 = 0,016$ $p_1 = 0,032$ $p_2 = 0,044$ $p_3 = 0,018$

Продолжение табл. 3
End of table 3

Показатель Characteristic	Обследованные Examined				
	Здоровые доноры $n = 20$ Healthy donors $n = 20$	Без АФП $n = 15$ Without ALF, $n = 15$	I–II ст. $n = 33$ I–II stages $n = 33$	III ст. $n = 17$ III stage $n = 17$	IV ст. $n = 12$ IV stage $n = 12$
	I	II	III	IV	V
CD45 ⁺ CD133 ⁺ , %	1,28 (1,23–1,32)	1,83 (1,79–1,87) $p_0 = 0,047$	3,28 (3,08–3,85) $p_0 = 0,020$ $p_1 = 0,044$	1,21 (1,09–1,32) $p_0 = 0,039$ $p_1 = 0,045$ $p_2 = 0,030$	0,72 (0,61–0,83) $p_0 = 0,023$ $p_1 = 0,035$ $p_2 = 0,031$ $p_3 = 0,048$

Полученные нами результаты у больных АФП на начальных и умеренных ст. фиброза частично согласуются с данными мировой литературы. Установлено, что при хронических заболеваниях печени, ассоциированных со снижением регенеративной способности гепатоцитов, регистрируются мобилизация стволовых гемопоэтических клеток из костного мозга и повышение их уровня в циркуляции и печени, опосредованные активацией миграционной оси, образованной хемокином, фактором стромальных клеток 1 (stromal cell-derived factor, SDF-1) и его рецептором CXCR4 [40, 41].

Как уже упоминалось ранее, воспаление является критическим фактором в инициации и поддержании процессов фиброгенеза печени и цирроза в результате действия различных гепатотоксических факторов.

Реакции воспаления с высвобождением медиаторов с провоспалительным действием (таких как IL-1α, IL-6 и TNFα) из поврежденных клеток способствуют рекрутингу реактогенных циркулирующих клеток крови в печень [41].

Логично предположить, что повышенные уровни клеток CD34 и CD133 в периферической крови пациентов, злоупотребляющих алкоголем, на начальных ст. фиброза связаны с персистирующим воспалением в паренхиме печени и дисбалансом между процессами ее повреждения, а также эндогенными репаративными возможностями. Следует отметить, что CD34 является маркером эндотелиальных клеток при хронических дегенеративных заболеваниях печени, характеризующихся капилляризацией синусоидов. Выраженность экспрессии CD34 имеет четкую ассоциацию с тяжестью поражения печеночной паренхимы. В то же время установлено, что часть клеток CD34, обнаруживаемых в печени, являются гемопоэтическими и принимают участие в ее регенерации [42].

В настоящее время инфузия клеток CD34 и CD133 в воротную вену и чревный ствол [42, 43], печеночную артерию пациентам с терминальной стадией цирроза печени может улучшить их клиническое состояние. Аналогичные исследования также показали, что стволовые гемопоэтические клетки, с одной стороны, способствуют регенерации и восстановлению функции печени в результате травмы [44].

С другой стороны, снижение количества клеток CD34 и CD133 в циркуляции на терминальных стадиях фиброза у обследованных нами пациентов, злоупотребляющих алкоголем, может свидетельствовать о нарастающей декомпенсации и истощении регенераторного потенциала организма на финальных стадиях дегенеративного процесса. Оценка содержания CD34- и CD133-позитивных клеток в периферической крови может быть использована как важный прогностический критерий, свидетельствующий о регенеративной активности организма в ответ на повреждение печеночной паренхимы.

В целом выяснение роли нарушений межклеточной кооперации иммунокомпетентных клеток и гепатоцитов, индуцированных гепатотоксическими факторами, значительно расширит представления о фундаментальных механизмах, опосредующих патологическое ремоделирование печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У больных АФП с терминальными (III–V) ст. фиброза на фоне лимфопении регистрируется снижение (относительно контроля и группы сравнения) содержания основных субпопуляций лимфоцитов: CD45⁺CD3⁺, CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺, CD45⁺CD3⁺CD19⁺ и CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺, тогда как на начальных и умеренных (I–II) ст. выявлено повышение изучаемых показателей. Обнаружена негативная ассоциация

относительного числа лимфоцитов (CD45) со стадией фиброза печени.

Снижение числа НК-клеток в периферической крови у хронических алкоголиков на терминальных стадиях заболевания может способствовать угнетению их антифибротических эффектов.

У всех больных АФП выявлено достоверное увеличение содержания (%) эффекторных Т-клеток памяти T_{EM} , в том числе T_{EMRA} , на фоне снижения популяций T_N и T_{CM} по сравнению с параметрами условно здоровых доноров и пациентов без АФП. Обнаруженные нами изменения на продвинутых стадиях фиброза позволяют предположить факт прямой дифференцировки наивных Т-клеток и Т-лимфоцитов центральной памяти в эффекторные, что может усугублять течение тканедеструктивного процесса за счет высокой биоцидной активности эффекторных клеток и их миграции в очаг повреждения.

Высокий уровень (относительно результатов контроля и группы сравнения) гемопоэтических (CD34 и CD133) клеток у больных АФП на начальных и умеренных стадиях фиброза значительно снижается на более продвинутых, что свидетельствует о декомпенсации и истощении регенераторного потенциала организма на финальных стадиях дегенеративного процесса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- World Health Organization. World Health Report 2011: Global status report on alcohol and health. Switzerland, 2011: 286.
- Celli R., Zhang X. Pathology of alcoholic liver disease. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2014; 2(2): 103–109. DOI: 10.14218/JCTH.2014.00010.
- Miller A.M., Horiguchi N., Jeong W.I., Radaeva S., Gao B. Molecular mechanisms of alcoholic liver disease: innate immunity and cytokines. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2011; 35 (5): 787–793. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2010.01399.x.
- Robinson M.W., Harmon C., O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cellular and Molecular Immunology*. 2016; 13 (3): 267–276. DOI: 10.1038/cmi.2016.3.
- Barr T., Helms C., Grant K. Messaoudi I. Opposing effects of alcohol on the immune system. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2016; 65: 242–251. DOI: org/10.1016/j.pnpbp.2015.09.001.
- Curtis B.J., Zahs A., Kovacs E.J. Epigenetic targets for reversing immune defects caused by alcohol exposure. *Alcohol. Res.* 2013; 35 (1): 97–113.
- Кремер Н.Ш. Высшая математика для экономистов. М.: Юнити, 2004: 472. [Kremer N.Sh. Higher mathematics for economists. Moscow: Unity, 2004: 472 (in Russ.)].
- Laso F.J., Almeida J., Torres E., Vaquero J.M., Marcos M., Orfao A. Chronic alcohol consumption is associated with an increased cytotoxic profile of circulating lymphocytes that may be related with the development of liver injury. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2010; 34 (5): 876–885. DOI: org/10.1111/j.1530-0277.2010.01160.x.
- Газатова Н.Д., Юрова К.А., Гаврилов Д.В., Литвинова Л.С. Алкоголь и иммунитет. Гены и Клетки. 2018; 13 (1): 47–55. [Gazatova N.D., Yurova K.A., Gavrilov D.V., Litvinova L.S. *Alcohol and immunity. Genes and Cells*. 2018; 13 (1): 47–55 (in Russ.)].
- Pasala S., Barr T., Messaoudi I. Impact of alcohol abuse on the adaptive immune system. *Alcohol. Res.* 2015; 37 (2): 185–197.
- Matos L.C., Batista P., Monteiro N., Ribeiro J., Cipriano M.A., Henriques P., Fernando G. Carvalho A. Lymphocyte subsets in alcoholic liver disease. *World Journal of Hepatology*. 2013; 5 (2): 46–55. DOI: 10.4254/wjh.v5.i2.46.
- Lombardo L., Capaldi A., Poccardi G., Vineis P. Peripheral blood CD3 and CD4 T-lymphocyte reduction correlates with severity of liver cirrhosis. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1995; 25: 153–156.
- Naude C.E., Bouic P., Senekal M., Kidd M., Ferrett H.L., Fein G., Carey P.D. Lymphocyte measures in treatment-naïve 13–15-year old adolescents with alcohol use disorders. *Alcohol*. 2011; 45: 507–514. DOI: 10.1016/j.alcohol.2011.02.307.
- Arosa F.A., Porto G., Cabeda J.M., Lacerda R., Resende D., Cruz E., Cardoso C., Fonseca M., Simxes C., Rodrigues P. Expansions of CD8+CD28- and CD8+T-cRVbeta5.2+ T cells in peripheral blood of heavy alcohol drinkers. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2000; 24: 519–527. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2000.tb02020.x.
- Zaldivar Fujigaki J.L., Arroyo Valerio A.G., Lypez Alvarenga J.C., Gutiérrez Reyes E.G., Kershenobich D., Hernández Ruiz J. Alterations in activation, cytotoxic capacity and trafficking profile of peripheral CD8 T-cells in young adult binge drinkers. *PLoS One*. 2015; 10 (7): e0132521. DOI: 10.1371/journal.pone.0132521.
- Kaech S.M., Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 2012; 12 (11): 749–761.
- Safadi R., Ohta M., Alvarez C.E., Fiel M.I., Bansal M., Mehal W.Z., Friedman S.L. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin – 10 from hepatocytes. *Gastroenterology*. 2004; 127 (3): 870–882. DOI: 10.1038/nri3307.
- Karim S., Liaskou E., Hadley S., Youster J., Faint J., Adams D.H., Lalor P.F. An in vitro model of human acute ethanol exposure that incorporates CXCR3 – and CXCR4-dependent recruitment of immune cells. *Toxicol. Sci.* 2013; 132 (1): 131–141. DOI: 10.1093/toxsci/kfs337.
- Szuster-Ciesielska A., Daniluk J., Bojarska-Junak A. Apoptosis of blood mononuclear cells in alcoholic liver cirrhosis. The influence of in vitro ethanol treatment and zinc supplementation. *Toxicology*. 2005; 212 (2–3): 124–134. DOI: 10.1016/j.tox.2005.04.009.

20. Muhanna N., Doron S., Wald O., Horani A., Eid A., Papo O., Friedman S.L., Safadi R. Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocytes: a novel pathway of fibrogenesis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2008; 48 (3): 963–977. DOI: 10.1002/hep.22413.
21. Couzigou P., Vincendeau P., Fleury B., Richard-Molard B., Pierron A., Bergeron J.L., Bezian J.H., Amouretti M., Béraud C. Changes in circulating lymphocyte subsets in alcoholic hepatopathies. Respective role of alcohol, hepatocellular insufficiency and malnutrition. *Gastroenterol. Clin. Biol*. 1984; 8 (12): 915–919.
22. Matsuki F., Saegusa J., Miyamoto Y., Misaki K., Kumagai S., Morinobu A. CD45RA-Foxp3(high) activated/effector regulatory T cells in the CCR7⁺ CD45RA⁺CD27⁺ CD28⁺ central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2013; 438 (4): 778–783. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.05.120.
23. Bhargava P. Novel therapies for memory cells in autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol*. 2015; 180 (3): 353–360. DOI: 10.1111/cei.12602.
24. Zhang H., Meadows G.G. Chronic alcohol consumption in mice increases the proportion of peripheral memory T-cells by homeostatic proliferation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005; 78 (5): 1070–1080.
25. Min B., Foucras G., Meier-Schellersheim M., Paul, W.E. Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101 (11): 3874–3879.
26. Chou J.P., Effros R.B. T-cell replicative senescence in human aging. *Curr. Pharm. Des*. 2013; 19 (9): 1680–1698.
27. Appay V., Sauce D. Naive T-cells: the crux of cellular immune aging? *Exp. Gerontol*. 2014; 54: 90–93. DOI: 10.1016/j.exger.2014.01.003.
28. Peng H., Wisse E., Tian Z. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cell Mol. Immunol*. 2016; 13(3): 328–336. DOI: 10.1038/cmi.2015.96.
29. Zhou J., Meadows G.G. Alcohol consumption decreases IL-2-induced NF κ B activity in enriched NK cells from C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci*. 2003; 73 (1): 72–79.
30. Jeong W.I., Park O., Gao B. Abrogation of the anti-fibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008; 134 (1): 248–258. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.09.034.
31. Zhang F., Little A., Zhang H. Chronic alcohol consumption inhibits peripheral NK cell development and maturation by decreasing the availability of IL-15. *J. Leukoc. Biol*. 2017; 101 (4): 1015–1027. DOI: 10.1189/jlb.1A0716-298RR.
32. Jeong W.I., Gao B. Innate immunity and alcoholic liver fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2008; 23 (1): 112–118. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.05274.x.
33. Pan H.N., Sun R., Jaruga B., Hong F., Kim W.H., Gao B. Chronic ethanol consumption inhibits hepatic natural killer cell activity and accelerates murine cytomegalovirus-induced hepatitis. *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 2006; 30 (9): 1615–1623.
34. Zeiser R., Sarantopoulos S., Blazar B. R. B-cell targeting in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2018; 131 (13): 1399–1405. DOI: 10.1182/blood-2017-11-784017.
35. Wang H., Zhou H., Mahler S., Chervenak R., Wolcott M. Alcohol Affects the Late Differentiation of Progenitor B Cells. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. 2011; 46 (1): 26–32. DOI: 10.1093/alcalc/agq076.
36. Serreze D.V., Chapman H.D., Varnum D.S., Hanson M.S., Reifsnnyder P.C., Richard S.D., Fleming S.A., Leiter E.H., Shultz L.D. B lymphocytes are essential for the initiation of T-cell –mediated autoimmune diabetes: analysis of a new “speed congenic” stock of NOD. Ig mu null mice. *J. Exp. Med*. 1996; 184 (5): 2049–2053.
37. Chan O.T., Madaio M.P., Shlomchik M.J. B cells are required for lupus nephritis in the polygenic, Fas–intact MRL model of systemic autoimmunity. *J. Immunol*. 1999; 163 (7): 3592–3596.
38. Novobrantseva T.I., Majeau G.R., Amatucci A., Kogan S., Brenner I., Casola S., Mark J. Shlomchik, Koteliansky, Hochman P.S., Ibraghimov A. Attenuated liver fibrosis in the absence of B-cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115 (11): 3072–3082.
39. Lizier M., Castelli A., Montagna C., Lucchini F., Vezzoni P., Faggioli F. Cell fusion in the liver, revisited. *World J. Hepatol*. 2018; 10 (2): 213–221. DOI: 10.4254/wjv.10.i2.213.
40. Körbling M., Katz R.L., Khanna A., Ruifrok A.C., Rondon G., Albitar M., Champlin R.E., Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral – blood stem cells. *N. Engl. J. Med*. 2002; 346 (10): 738–746.
41. Abdellatif H. Circulating CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells paralleled with level of viremia in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Regen Med. Res*. 2018. 6: 1. DOI: 10.1051/rmr/170005.
42. Бурганова Г.Р., Абдулхаков С.Р., Гумерова А.А., Газизов И.М., Йылмаз Т.С., Титова М.А., Одинцова А.Х., Кундакчян Г.Г., Фаррахов А.З., Киясов А.П. CD34, α -SMA и BCL-2 как маркеры эффективности трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток больным алкогольным циррозом печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2012; 9: 16–22. [Burganova G.R., Abdulkhakov S.R. Gumerova A.A. Gazizov I.M. Yylmaz T.S. Titova M.A. Odintsova A.Kh., Kundakchyan G.G., Farrakhov A.Z., Kiyasov A.P. CD34, α -SMA and BCL-2 as markers of transplantation efficiency of autologous hematopoietic stem cells in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Experimental and clinical gastroenterology*. 2012; 9: 16–22 (in Russ.)].
43. Salama H., Zekri A.R., Bahnassy A.A., Medhat E., Halim H.A., Ahmed O.S., Mohamed G., Al Alim S.A., Sherif G.M. Autologous CD34⁺ and CD133⁺ stem cells transplantation in patients with end stage liver disease. *World J. Gastroenterol*. 2010; 16 (42): 5297–5305.
44. Kwak K.-A., Cho H.-J., Yang J.-Y., Park Y.-S. Current Perspectives Regarding Stem Cell-Based Therapy for Liver Cirrhosis. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2018; ID 4197857: 19. DOI: 10.1155/2018/4197857.

Вклад авторов

Газатова Н.Д. – проведение практической части исследования. Юрова К.А. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. Гаврилов Д.В. – проведение практической части исследования, разработка дизайна, анализ и интерпретация клинических данных. Вульф М.А., Тодосенко Н.М. – проведение практической части исследования, анализ и интерпретация данных. Новицкий В.В. – разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Литвинова Л.С. – разработка дизайна, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи.

Сведения об авторах

Газатова Наталья Динисламовна, науч. сотрудник, Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0002-4646-3436.

Юрова Кристина Алексеевна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0001-6146-3330.

Гаврилов Дмитрий Владимирович, зав. наркологическим отделением, врач-психиатр, нарколог, Наркологический диспансер Калининградской области, г. Калининград. ORCID iD 0000-0002-8871-2808.

Вульф Мария Александровна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0002-4989-045X.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9577-8370.

Тодосенко Наталья Михайловна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0001-7468-4861.

Литвинова Лариса Сергеевна, д-р мед. наук, зав. Базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ И. Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0001-5231-6910.

(✉) Литвинова Лариса Сергеевна, e-mail: larisalitvinova@yandex.ru.

Authors contribution

Gazatova N.D. – carrying out the research. Yurova K.A. – conception and design, analysis and interpretation of the data. Gavrilov D.V. – carrying out of the research, conception and design, analysis and interpretation of the data. Vulf M.A., Todosenko N.M. – carrying out of the research, analysis and interpretation of the data. Novitsky V.V. – conception and design, critical revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript for publication. Litvinova L.S. – conception and design, analysis and interpretation of the data, drafting of the manuscript.

Authors information

Gazatova Natalya D., Researcher, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4646-3436.

Yurova Kristina A., PhD, Researcher Fellow, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-6146-3330.

Gavrilov Dmitry V., Head of the DDKG, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8871-2808.

Vulf Mariia A., PhD, Researcher Fellow, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4989-045X.

Novitskiy Vyacheslav V., DM, Professor, Academician of RAS, Department of Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9577-8370.

Todosenko Natalia M., PhD, Researcher Fellow, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-7468-4861.

Litvinova Larisa S., DM, Head of the Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5231-6910.

(✉) Litvinova Larisa S., e-mail: larisalitvinova@yandex.ru.

Received 18.09.2018

Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 18.09.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Иммунофенотип макрофагальной популяции при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких

Голубинская Е.П., Филоненко Т.Г., Кубышкин А.В., Ермола Ю.А.,
Кальфа М.А., Геращенко А.В., Крамарь Т.В.

*Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, Крымский федеральный университет (КФУ) имени В.И. Вернадского
Россия, Республика Крым, 295051, г. Симферополь, бульвар Ленина, 5/7*

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: изучение иммунофенотипа макрофагальной популяции и механизмов их векторного перераспределения при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких.

Материалы и методы. Материалом для исследования явились фрагменты стенки каверны и перикавернозной легочной ткани прооперированных по поводу фиброзно-кавернозного туберкулеза (ФКТ) легких ($n = 163$). Все пациенты были разделены на две основные группы (с активным бактериовыделением (МБТ+, $n = 84$) и клиническим абациллированием (МБТ–, $n = 79$)) для проведения иммуногистохимического исследования с панелью маркеров: макрофагов и гистиоцитов – CD68; сосудистого фактора роста А – VEGF-A; Т-хелперов CD4, цитотоксических Т-лимфоцитов CD8.

Результаты. При анализе экспрессии маркера CD68 установлена популяционная неоднородность макрофагов в зависимости от интенсивности цитоплазматической реакции функциональной активности с различными локализационными и количественными характеристиками: высокоактивные (тип 1), умеренно активные (тип 2) и слабоактивные (тип 3). На основании реакции с сосудистым фактором ростом А определено, что клетки VEGF⁺ соответствуют слабоактивным макрофагам CD68⁺ и локализуются на границе перехода специфической грануляционной ткани в фиброзный слой, перикавернозной зоне и интактной легочной ткани со статистически значимым преобладанием у пациентов с МБТ– ($p < 0,05$). Независимо от активности бактериовыделения число клеток VEGF⁺ в зоне лимфоидных фолликулов прямо коррелирует с количеством макрофагов CD68⁺ в перикавернозной зоне ($R = 0,68$) и обратно – с числом VEGF⁺ диффузно рассеянных клеток в фиброзной капсуле ($R = \text{макрофагов } 0,75$). При этом CD68⁺/VEGF⁺ визуализируются в зоне CD8⁺ Т-лимфоцитов, а CD68⁺/VEGF[–] – в зоне скоплений клеток CD4⁺. Такой характер корреляционной взаимосвязи свидетельствует о перераспределении макрофагов во второй тип, обладающих ремоделирующим действием на окружающие ткани при потенцирующем участии клеток лимфоидной популяции.

Ключевые слова: фиброзно-кавернозный туберкулез, макрофаги, иммунофенотип, иммунитет, иммуногистохимия.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом при Медицинской академии имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского (протокол № 11 от 23.10.1017).

Для цитирования: Голубинская Е.П., Филоненко Т.Г., Кубышкин А.В., Ермола Ю.А., Кальфа М.А., Геращенко А.В., Крамарь Т.В. Иммунофенотип макрофагальной популяции при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 190–200. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-190-200>.

УДК 616.24-002.54:612.017:577.27

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-190-200>

Immunophenotype of the macrophage population in fibrous, cavernous pulmonary tuberculosis

Golubinskaya E.P., Filonenko T.G., Kubyshev A.V., Yermola Yu.A., Kalfa M.A., Gerashchenko A.V., Kramar T.V.

Medical Academy named after S.I. Georgievsky, Crimean Federal University (CFU) named after Vernadsky 5/7, Lenin Blv., Simferopol, 295051, Republic of Crimea, Russian Federation

ABSTRACT

Objective: to study the immunophenotype of the macrophage population and the mechanisms of their vectorial redistribution in fibrous cavernous pulmonary tuberculosis.

Materials and methods. The material for the study was fragments of the fibrous cavern wall and pericavernous lung tissue of the dead or surgical patients diagnosed with fibrous cavernous tuberculosis ($n = 163$). All patients were divided into 2 main groups: patients with active bacteria excretion (MTB+, $n = 84$) and patients with clinical abacillation (MTB–, $n = 79$) for immunohistochemistry with a panel of markers for: macrophages and histiocytes – CD68; vascular growth factor A – VEGF-A; T-helpers – CD4, and T-cytotoxic lymphocytes – CD8.

Results. Following the analysis of CD68 expression, the population heterogeneity of macrophages was revealed depending on the intensity of the cytoplasmic reaction, functional activity, localization and quantitative characteristics. Three groups were identified: highly active, moderately active and weakly active. Based on the reaction with vascular growth factor A, it was determined that VEGF⁺ cells correspond to weakly active CD68⁺ macrophages and are located on the border between the specific granulation tissue and fibrous layer as well as in the pericavernous zone and intact lung tissue with a statistically significant predominance in patients with MTB– ($p < 0.05$). Regardless of the scope of bacterial secretion, the number of VEGF⁺ cells in the lymphoid follicle zone directly correlates with that of CD68⁺ macrophages in the pericavernous zone ($R = 0.68$) and indirectly correlates with the number of diffusely scattered VEGF⁺ cells in the fibrous capsule ($R = -0.75$). In the meantime, CD68⁺/VEGF⁺ are visualized in the zone of CD8⁺ T-lymphocytes, and CD68⁺/VEGF[–] – in the zone of CD4⁺ cell clusters. Such correlation indicates the redistribution of macrophages into type 2, which has a remodeling effect on the surrounding tissues with the potentiating participation of lymphoid cells.

Key words: fibrous cavernous pulmonary tuberculosis, macrophages, immunophenotype, immunity, immunohistochemistry.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of funding. The authors state that they received no funding for the study.

Compliance with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee at the Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky (Protocol No. 11 of 23.10.1017).

For citation: Golubinskaya E.P., Filonenko T.G., Kubyshev A.V., Yermola Yu.A., Kalfa M.A., Gerashchenko A.V., Kramar T.V. Immunophenotype of the macrophage population in fibrous, cavernous pulmonary tuberculosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 190–200. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-190-200>.

ВВЕДЕНИЕ

Неуклонный рост числа пациентов с различными формами туберкулезной инфекции, в том числе в ассоциации с ВИЧ-инфекцией, вызвал бум научных исследований в направлении иммунологии туберкулеза [1, 2]. Достоверно установлена взаимосвязь прогрессирования альтеративно-экссудативных реакций и уровня иммунодефицита по мере уменьшения количества клеток CD4⁺ [3, 4]. Однако в условиях длительно протекающего туберкулезного процесса без коморбидной патологии отмечается формирование иммунопатологических состояний. Ряд зарубежных исследователей предполагают, что вторичная иммунологическая недостаточность при туберкулезе может быть детерминирована непосредственно *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) путем иницирующего воздействия на дендритные и другие антигенпрезентирующие клетки, в частности макрофаги, что запускает каскадный цикл выброса цитокинов, хемокинов и других активных веществ, изменяющих соотношение провоспалительных и противовоспалительных механизмов [5, 6].

В экспериментальных работах *in vitro* установлен факт популяционной функциональной неоднородности макрофагов и выделены два основных фенотипа. Считается, что макрофаги первого типа (M1) иницируют воспалительную реакцию, проявляя высокую цитотоксическую и бактерицидную активность и поддерживая Th1-зависимый иммунный ответ. В то же время клетки M2 участвуют в реструктуризации межклеточного матрикса за счет активизации межклеточных взаимодействий с фибробластами и эндотелиоцитами, приводя к разрастанию соединительной ткани и неоангиогенезу в очаге поражения [7–9].

Наличие данных о полиморфизме популяции макрофагов позволяет предположить, что последующая цепь клеточных взаимодействий и их синтетической активности приводит к формированию гиперчувствительности замедленного типа и необратимому ремоделированию легочной паренхимы с развитием деструктивных изменений в виде формирования полости распада и массивной диссеминации патогена [10]. Именно изучение функциональных особенностей макрофагов, их координации с другими клеточными элементами системы местной защиты легких (потенцирующее либо блокирующее воздействие на процессы коллагенообразования, неоангиогенез, сурфактантная система) может позволить составить персональный макрофагальный профиль больного с возможностью оценки эффективности терапии либо прогрессирования заболевания. В связи с

чем целью нашего исследования явилось изучение иммунофенотипа макрофагальной популяции и механизмов их векторного перераспределения при фиброзно-кавернозном туберкулезе (ФКТ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования явились фрагменты стенки каверны и перикавернозной легочной ткани прооперированных по поводу ФКТ легких ($n = 163$). Все пациенты были разделены на группы: группа 1 – ФКТ легких с активным бактериовыделением (МБТ+), $n = 84$; группа 2 – ФКТ легких с клиническим абациллированием (МБТ–), $n = 79$. В качестве контрольной группы для сравнения морфологических показателей были использованы фрагменты легких 30 больных, умерших от патологии, не связанной с заболеваниями легких (инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения). Критерии включения пациентов в исследование: возраст 18–65 лет, отрицательные клинико-лабораторные данные наличия коморбидной патологии (вирусных гепатитов В, С и ВИЧ), обострения хронических заболеваний других органов и систем, информированное согласие.

Для стандартного гистологического исследования фрагменты стенки каверны, перикавернозной зоны и макроскопически интактной легочной ткани фиксировались в 10%-м нейтральном формалине с последующей парафинизацией и изготовлением серийных срезов толщиной 4–5 мм. Визуализация патологических изменений осуществлялась путем окраски гематоксилином и эозином [11].

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили по стандартизированной методике с использованием серийных парафиновых срезов толщиной 3–5 мкм, помещенных на адгезивные стекла, покрытые полизином (Menzel-Glaser, Германия) и реактивов компании Dako (Дания). ИГХ панель включала в себя следующие антитела: маркер макрофагов и гистиоцитов, кластер дифференцировки 68, макросиалин – CD68 (клон KP1), маркер сосудистого фактора роста A VEGF-A (клон VG1), маркер кластера дифференцировки лимфоцитов Т-хелперов CD4 (клон 4B12), маркер кластера дифференцировки лимфоцитов Т-цитотоксических CD8 (клон C8/144B). Система визуализации EnVisionTMFLEX на автостейнере фирмы Dako.

Количественная оценка позитивных клеток проводилась с учетом зонального распределения (зона казеозного некроза, специфическая грануляционная ткань, фиброзный слой, перикаверно-

зная зона, дренирующий бронх, интактная легочная ткань) и характера взаимодействия с другими структурными элементами ткани легкого. Оценку количества клеток проводили в 10 полях зрения при увеличении 200.

Интенсивность экспрессии макросиалина (CD68) оценивали полуколичественным методом на основании выраженности окраски и количества гранул в цитоплазме по следующей схеме: слабая (мембранная экспрессия со слабым диффузным окрашиванием цитоплазмы и рассеянным небольшим количеством зерен), умеренная (равномерно расположенные зерна в цитоплазме на фоне неравномерной мембранной реакции) и выраженная (интенсивная цитоплазматическая окраска с компактным расположением зерен).

Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли с помощью светового микроскопа Olympus CX-41, Olympus digital camera C5050 zoom. Морфометрическая обработка полученных данных проводилась с помощью лицензионного программного обеспечения ImageJ.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программного пакета Statistica for Microsoft Windows, version 10.0. (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде $M \pm SD$, где SD – стандартное отклонение. Статистический анализ включал построение вариационных рядов количественных данных, определение нормальности распределения вариационных рядов с использованием критерия Колмогорова – Смирнова, вычисление среднего арифметического значения, среднеквадратического отклонения, ошибки средней величины, коэффициента вариации и величины отклонения показателя от контроля в

процентах. Статистическая значимость различий сравниваемых величин определялась при помощи однофакторного дисперсионного анализа, для сравнения двух независимых групп применяли двухвыборочный критерий Стьюдента. Для оценки статистической взаимосвязи рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В процессе рутинного гистологического исследования установлено, что макрофагальная популяция имеет структурные и количественные особенности в зависимости от приближенности к очагу деструкции. Выделено несколько микроскопически идентифицируемых видов макрофагов, имеющих различную локализацию и функциональную активность: альвеолярные и эпителиоидные макрофаги, пенистые клетки, гигантские многоядерные клетки Пирогова – Лангханса. При анализе экспрессии маркера CD68 и в образцах VEGF легких изучаемых групп зафиксировано наличие стойкого диффузного окрашивания в пиогенном слое.

При оценке клеточной экспрессии указанных маркеров установлено динамическое уменьшение количества CD68⁺ макрофагов по мере удаления от очага некроза с пиковыми показателями в грануляционной ткани – $143,45 \pm 5,27$ (ФКТ МБТ+) и $117,32 \pm 3,03$ (ФКТ МБТ–). В прилегающей зоне эмфиземы $9,16 \pm 0,45$. При этом в случаях ФКТ МБТ– регистрировалась аналогичная динамика со статистически значимыми количественными межгрупповыми отличиями как относительно контрольной группы, так и ФКТ МБТ+ (рис. 1).

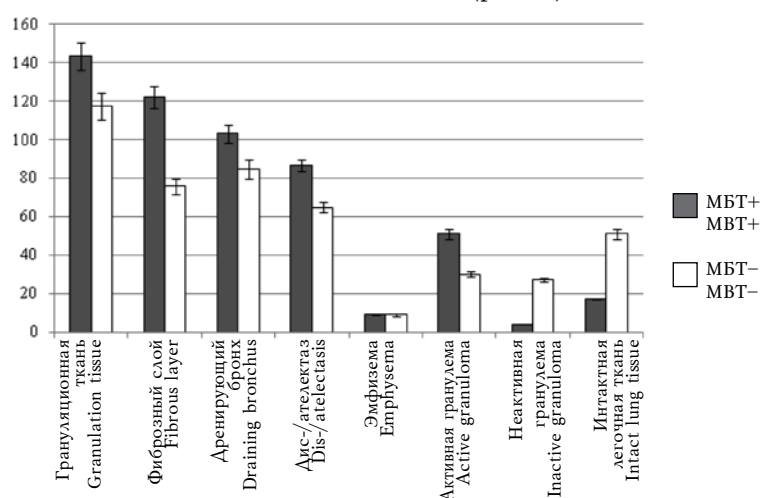


Рис. 1. Распределение макрофагов CD68⁺ во фрагментах легочной ткани при фиброзно-кавернозном туберкулезе в зависимости от активности бактериовыделения

Fig. 1. Distribution of CD68⁺ macrophages in the fragments of the lung tissue under fibrous cavernous tuberculosis depending on the scope of bacterial excretion

В зоне перехода пиогенного слоя в зону специфических грануляций фиксировалось абсолютное превалирование высоко- и умеренно активных CD68+ клеток независимо от активности бактериовыделения. В то же время в обеих группах слабоактивные клетки, как правило, располагались на границе перехода грануляционной ткани в фиброзный слой и соответствовали, в том чис-

ле, верифицированным гистологически пенистым клеткам и малым эпителиоидным клеткам.

Данная клеточная популяция с нечеткой мембранной экспрессией, слабым диффузным окрашиванием цитоплазмы и немногочисленными рассеянными зернами составляла одну четверть всех позитивных макрофагов в группе ФКТ МБТ+ (табл. 1).

Т а б л и ц а 1
Table 1

Количественные характеристики популяции макрофагов в зависимости от интенсивности реакции с маркером CD68, $M \pm SD$									
Quantitative characteristics of the macrophage population depending on the intensity of the cytoplasmic reaction with CD68, $M \pm SD$									
Зона Zone	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> +				<i>Mycobacterium tuberculosis</i> –				Контроль Control
	C W	У M	В H	Всего Total	C W	У M	В H	Всего Total	
Пиогенный слой Pyogenic layer	+++				+/-				23,7 ± 0,03
Грануляционная ткань Granulation tissue	33,50 ± 2,18	42,82 ± 3,04*	67,13 ± 1,93*	143,45 ± 7,01*	48,65 ± 1,13*	28,22 ± 0,97#	40,22 ± 1,08*#	117,09 ± 7,07*#	23,7 ± 0,03
Фиброзный слой Fibrous layer	37,48 ± 2,03*	30,51 ± 1,63	54,12 ± 2,01*	122,11 ± 5,79*	29,99 ± 0,41#	12,89 ± 0,08*#	32,71 ± 0,71#	75,59 ± 4,16*#	23,7 ± 0,03
Дренирующий бронх Draining bronchus	22,04 ± 1,01	21,36 ± 0,08	59,64 ± 2,21*	103,04 ± 4,69*	35,68 ± 3,22*#	30,08 ± 2,21#	18,68 ± 0,04*#	84,44 ± 4,74*#	23,7 ± 0,03
Дис-/ателектаз Dis-/atelectasis	19,08 ± 0,05	29,32 ± 1,01	38,34 ± 2,02*	86,74 ± 3,18*	24,21 ± 0,33	22,35 ± 0,12#	18,36 ± 0,11*#	64,92 ± 2,71*#	23,7 ± 0,03
Эмфизема Emphysema	3,91 ± 0,03*	1,98 ± 0,01*	3,27 ± 0,01*	9,16 ± 0,49*	3,95 ± 0,24*	2,04 ± 0,13*	3,11 ± 0,11*	9,10 ± 0,74*	23,7 ± 0,03
Активная гранулема Active granuloma	5,42 ± 0,03*	8,05 ± 0,23*	45,09 ± 1,43*	58,56 ± 2,72*	3,49 ± 0,32*	7,72 ± 0,09*	37,51 ± 1,16*	48,72 ± 2,31*	23,7 ± 0,03
Неактивная гранулема Inactive granuloma	13,16 ± 0,03*	4,01 ± 0,04*	10,09 ± 0,76*	27,26 ± 1,10*	9,27 ± 0,34*	2,11 ± 0,02*	6,94 ± 0,26*#	18,32 ± 0,02*#	23,7 ± 0,03
Интактная легочная ткань Intact lung tissue	21,78 ± 0,03	17,23 ± 0,36*	12,24 ± 0,21*	51,23 ± 2,63*	10,89 ± 1,11*#	10,28 ± 0,56*#	9,02 ± 0,12*	30,19 ± 1,29*#	23,7 ± 0,03

Примечание. С – слабоактивные макрофаги, У – умеренно активные макрофаги, В – высокоактивные макрофаги; +++ – выраженная реакция, +/- – слабая реакция.

*различие по отношению к группе контроля; # – различие по отношению к группе с активным бактериовыделением ($p < 0,05$).
Note. C-weakly active macrophages, M – moderately active macrophages, H – highly active macrophages; +++ – pronounced reaction, +/- – weak reaction.

*statistically significant difference as opposed to the control group; # statistically significant difference as opposed to the group with intense bacterial excretion ($p < 0,05$).

При анализе экспрессии CD68 у пациентов с клиническим абациллированием данные клеточные соотношения варьировались в зависимости от наличия либо отсутствия пиогенного слоя. Так, у пациентов с повышенной реактивностью (неравномерные наложения казеозных масс на внутренней стенке каверны) третью часть всех макрофагов

составляли слабоактивные. Однако у пациентов с двухслойной каверной количество высоко- и слабо активированных клеток в большинстве случаев выравнивалось (соотношение 1 : 1) за счет стабилизации экссудативно-альтеративных процессов.

В результате анализа ИГХ реакции с маркером VEGF-A в стенке каверны установлена

стойкая диффузная окраска казеозного некроза. Цитоплазматическая экспрессия зафиксирована в клетках гистиоцитарного происхождения, в ре-

зультате чего нами было определено два иммунофенотипа макрофагов: тип 1 (CD68⁺/VEGF⁻) и тип 2 (CD68⁺/VEGF⁺) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2
T a b l e 2

Количественные характеристики иммунопозитивных VEGF-A и макрофагов CD68 по отношению к очагу специфического воспаления, $M \pm SD$						
Quantitative characteristics of immunopositive VEGF-A and CD68 macrophages with relation to the focus of specific inflammation, $M \pm SD$						
Зона Zone	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> +		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -		Контроль Control	
	VEGF-A	CD68	VEGF-A	CD68	VEGF-A	CD68
Пиогенный слой Pyogenic layer	+++	+++	+/-	+/-	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30
Грануляционная ткань Granulation tissue	33,50 ± 1,03*	143,45 ± 7,01*	43,12 ± 1,12*	117,31 ± 7,08*#	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30
Фиброзный слой Fibrous layer	38,01 ± 1,15*	122,11 ± 5,79*	29,41 ± 0,83*	75,71 ± 4,17*#	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30
Дренирующий бронх Draining bronchus	35,54 ± 1,87*	103,05 ± 4,69*	84,69 ± 3,51*#	84,69 ± 4,75*#	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30
Дис-/ателектаз Dis-/atelectasis	42,12 ± 1,01	86,74 ± 3,19*	47,24 ± 1,82*	64,92 ± 2,71*#	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30
Эмфизема Emphysema	8,01 ± 0,82	9,16 ± 0,45*	7,30 ± 0,38	9,10 ± 0,74*	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30
Интактная легочная ткань Intact lung tissue	42,51 ± 1,49*	51,24 ± 2,63*	29,75 ± 1,01*#	30,19 ± 1,30#	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30

* различие по отношению к группе контроля ($p < 0,05$); # различие по отношению к группе с активным бактериовыделением ($p < 0,05$).

*statistically significant difference as opposed to the control group ($p < 0.05$); # statistically significant difference as opposed to the group with intense bacterial excretion ($p < 0.05$).

Клетки CD68⁺/VEGF⁻ локализовались преимущественно в зоне специфической грануляционной ткани на границе с пиогенным слоем и верифицировались как высоко или умеренно активированные. Слабоактивные CD68⁺/VEGF⁺ фиксировались на границе перехода грануляций в фиброзный слой.

На границе фиброзного слоя и окружающей перикавернозной зоны в обеих группах микроскопически определялась выраженная лимфоидная инфильтрация с формированием лимфоидных фолликулов как с активными светлыми герминативными центрами, так и относительно мономорфными по своей структуре. Во всех наблюдениях установлено, что из общего числа позитивно окрашенных макрофагов в фиброзном слое 70% локализованы в непосредственной близости от лимфоидных формирований.

Количество клеток VEGF⁺ в зоне лимфоидных фолликулов прямо коррелировало с количеством макрофагов CD68⁺ в перикавернозной зоне ($R = 0,68$) и отмечалась отрицательная корреляционная

связь по отношению к количеству VEGF⁺ диффузно рассеянных клеток в фиброзной капсуле ($R = -0,75$). Клетки CD68⁺/VEGF⁺ визуализировались в зоне CD8⁺ Т-лимфоцитов, а CD68⁺/VEGF⁻ – в зоне скоплений клеток CD4⁺ (рис. 2).

У всех пациентов группы ФКТ МБТ+ в дренирующем бронхе с типичным трехслойным строением максимальное количество высокоактивных макрофагов CD68 определялось в устье – (103,00 ± 1,2) позитивно окрашенных клетки. В окружающих участках серозной пневмонии регистрировался высокий уровень ИГХ экспрессии CD68 в виде очаговых скоплений высокоактивных (38,34 ± 1,1) и умеренно активных (29,32 ± 0,8) альвеолярных макрофагов и пенистых клеток, что свидетельствует об активизации гистиоцитарного пула в связи с прогрессией воспаления.

В участках частичного либо тотального спадения альвеол наблюдалась экспрессия высокоактивных альвеолярных макрофагов CD68⁺ в небольшом количестве, в основном фиксированных в альвеолярных нишах. В строме альвеолярных

перегородок зоны дистелектаза среди хронического лимфо-гистиоцитарного инфильтрата определялось около 22% тканевых макрофагов

CD68⁺ с низкой функциональной активностью ($19,08 \pm 0,7$), которые соответствовали клеткам VEGF⁺ (рис. 3).

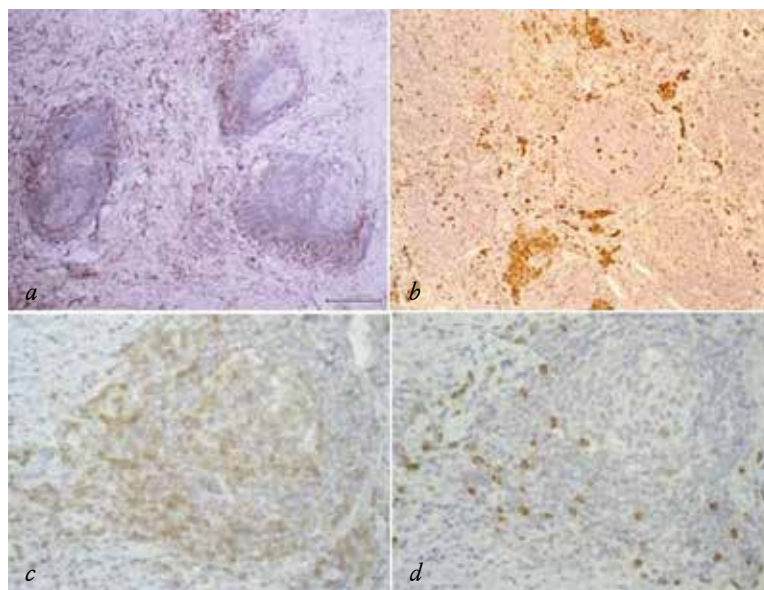


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция с маркерами VEGF-A: *a* – CD68, $\times 200$; *b* – CD4, $\times 200$; *c* – CD8, $\times 400$; *d* – в фиброзном слое каверны в области лимфоидных агрегатов, $\times 400$

Fig 2. Immunohistochemical reaction with markers of VEGF-A: *a* – CD68, $\times 200$; *b* – CD4, $\times 200$; *c* – CD8, $\times 400$; *d* – in the fibrous cavern layer in the area of lymphoid cell aggregates, $\times 400$

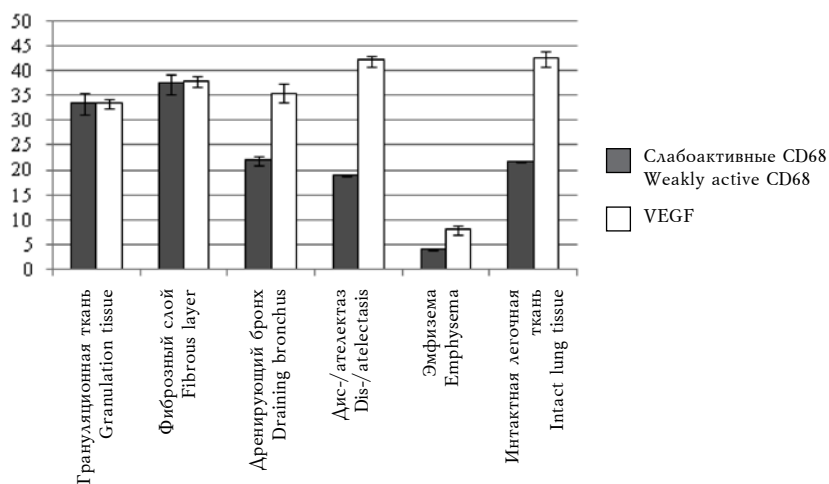


Рис. 3. Распределение слабоактивных макрофагов CD68⁺ в сопоставлении с VEGF⁺ клетками при фиброзно-кавернозном туберкулезе *Mycobacterium tuberculosis* +

Fig. 3. Distribution of weakly active CD68⁺ macrophages compared with VEGF⁺ cells under fibrous cavernous pulmonary tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* +

В очагах эмфизематозного вздутия определялось минимальное количество позитивно окрашенных макрофагов ($9,16 \pm 0,4$) при ФКТ МБТ+ и ($9,11 \pm 0,4$) при ФКТ МБТ–) в сравнении со всеми вышеописанными зонами независимо от активности бактериовыделения. В основном это были альвеолярные макрофаги со слабой функ-

циональной активностью, фиксированные на альвеолярной поверхности – ($8,01 \pm 0,4$) и ($7,29 \pm 0,4$) клеток VEGF⁺ соответственно. В просвете расширенных альвеол с истонченными перегородками свободно лежащих позитивно экспрессирующих маркеров CD68 либо клеток VEGF не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ

В современной медицине имеется большое количество научных работ, посвященных изучению патоморфоза различных форм туберкулеза, часть из них имеет экспериментальный характер, и лишь немногочисленные исследования отображают патогенетические аспекты *in vivo*, что связано, в том числе, и со сложностью забора материала для исследования [12]. Многочисленные научные работы посвящены клиническим сопоставлениям показателей активности туберкулеза в периферической крови пациентов [13, 14]. Однако они не являются показательными с точки зрения специфичности процесса и его локализации, так как практически невозможно сформировать «чистую» группу пациентов без сопутствующей патологии и, соответственно, определить истинную причину прогрессирующей иммунологической недостаточности [5, 16]. С этой точки зрения иммуногистохимические и молекулярно-генетические исследования более перспективны, поскольку отражают состояние клеточного звена локального иммунитета, межклеточных взаимодействий и особенностей их регуляции в реальных условиях непосредственно в очаге поражения и в окружающей легочной паренхиме.

В нашем исследовании в результате проведенного комплексного морфологического анализа образцов легких пациентов с фиброзно-кавернозным туберкулезом в зависимости от активности бактериовыделения установлена популяционная неоднородность клеток гистиоцитарного происхождения в зависимости от степени активации кластера дифференцировки 68 или макросиалина, который является членом семейства сквенджер-рецепторов (ScR) и широко используется как маркер макрофагов. Макросиалин, локализуясь на цитоплазматических гранулах, содержащих лизосомально-эндосомально ассоциированный мембранный гликопротеин 1 (LAMP-1), является показателем активации макрофагов в ответ на различные воспалительные стимулы [17].

Нами выделено три типа активности клеток CD68 на основании интенсивности реакции в условиях туберкулезного процесса: высокий, умеренный и слабый. Высокоактивные клетки CD68⁺ с интенсивным мембранно-цитоплазматическим окрашиванием, компактными и тесно расположенными зернами в цитоплазме свидетельствуют о гиперактивации макрофагов на фоне хронической стимуляции бактериальным липополисахаридом и неэффективности фагоцитоза *M. tuberculosis* и персистенции ее внутриклеточного паразитирования.

Слабоактивные макрофаги CD68 с нечеткой мембранной экспрессией и слабым диффузным окрашиванием цитоплазмы, единичными рассеянными зернами либо готовятся к фагоцитозу микобактерий, либо находятся в состоянии покоя.

Уменьшение количества высокоактивных на основании интенсивности окраски клеток CD68⁺ и параллельное нарастание пула слабоактивных макрофагов по мере отдаления от очага кавернозной деструкции позволило предположить наличие различных функциональных обязательств данных клеток не только в отношении фагоцитоза и презентации антигена иммунокомпетентными клетками, но и возможного противовоспалительного действия и ремоделирования окружающей легочной паренхимы.

Данное заключение базируется и на основании известного факта полиморфизма популяции макрофагов в условиях *in vitro* и *in vivo* у экспериментальных животных. Идентифицированы два фенотипа макрофагов: M1 (макрофаги 1-го типа, классически активированные) и M2 (макрофаги 2-го типа, альтернативно активированные) [18].

M1 – провоспалительные или цитотоксические, продуцируют интерлейкин (ИЛ) 12, индуцибельный оксид азота (iNOS), миелоид-зависимый протеин (MRP) 8/14 и фактор некроза опухоли (TNF) α , металлопротеиназу (MMP) 9, интерферон (ИФН) γ и потенцируют развитие клеток Th0 в Th1 [19]. M2 – противовоспалительные, продуцируют ИЛ-4, ИЛ-10, сосудистый фактор роста (VEGF), экспрессируют на поверхности маркера активации макрофагов CD163 и др. Это тип клеток интегрирован в Th2-ответ [20].

В нашем исследовании фрагменты легких пациентов с фиброзно-кавернозным туберкулезом клетки CD68⁺/VEGF⁺ локализовались преимущественно в зоне специфической грануляционной ткани на границе с пиогенным слоем, в устье дренирующего бронха, очагах серозной пневмонии и верифицировались как высоко- или умеренно активные. Зафиксированное статистически значимое превалирование таких клеток у пациентов с активным бактериовыделением в сравнении с группой ФКТ МБТ – обусловлено интенсификацией цитотоксических механизмов в связи с прогрессией альтеративно-экссудативных реакций, массивной бактериальной инсеминацией и необходимостью активизации фагоцитоза.

Клетки VEGF⁺ – слабоактивные макрофаги CD68⁺ – фиксируются на границе перехода грануляций в фиброзный слой, перикавернозной зоне и интактной легочной ткани со статистически значимым преобладанием у пациентов с МБТ – (рис. 4).

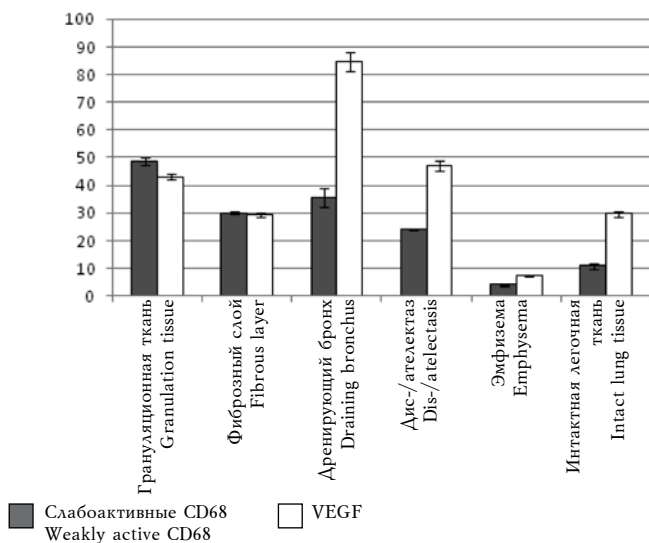


Рис. 4. Распределение слабоактивных макрофагов CD68⁺ в сопоставлении с клетками VEGF⁺ при фиброзно-кавернозном туберкулезе *Mycobacterium tuberculosis*—

Fig. 4. Distribution of weakly active CD68⁺ macrophages compared with VEGF⁺ cells under fibrous cavernous pulmonary tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*—

Независимо от активности бактериовыделения клетки VEGF⁺ в зоне лимфоидных фолликулов прямо коррелируют с количеством макрофагов CD68⁺ в перикавернозной зоне ($R = 0,68$) и обратно — с числом VEGF⁺ диффузно рассеянных клеток в фиброзной капсуле ($R = -0,75$). При этом CD68⁺/VEGF⁺ визуализируются в зоне CD8⁺ Т-лимфоцитов, а CD68⁺/VEGF⁻ — в зоне скопления клеток CD4⁺. Такой характер корреляционной взаимосвязи свидетельствует о перераспределении макрофагов во 2-й тип, обладающих ремоделирующим действием на окружающие ткани при потенцирующем участии клеток лимфоидной популяции.

По мере удаления от очага специфического воспаления происходит инверсия макрофагальной активности от провоспалительной к противовоспалительной. Такое функциональное перераспределение связано со снижением бактериальной инсеминации тканей и, возможно, является следствием индуктивной перестройки самих макрофагов микобактериями, направленной на одновременную маскировку от цитотоксического клеточного ответа и ремоделирование легочной ткани с целью создания комфортного микроокружения и достаточной аэрации в очаге специфического воспаления. Такая многозадачность реализуется с помощью механизма «ареста созревания фаголизосом», блокировки рецептора МНСI, активизации рецептора МНСII, что приводит к последующей дифференцировке клеток

Th0 в Th2 и перепрограммированию макрофагов в M2 с противовоспалительной функциональной направленностью. Как показано в наших предыдущих исследованиях процессов васкуляризации в условиях кавернозного туберкулеза, именно макрофаги VEGF⁺ путем гиперпродукции сосудистого фактора роста А приводят к разрастанию неполноценных в функциональном отношении сосудов с несформированной базальной мембраной и повышенным индексом проницаемости непосредственно в очагах специфического воспаления [21, 22]. В то же время векторное популяционное перераспределение макрофагов во 2-й тип в интактной легочной ткани также приводит к неэффективной гемодинамической микроциркуляции за счет нарушения сосудистой проницаемости и нарастания тканевой гипоксии. Далее происходит формирование альвеоло-капиллярного блока и прогрессирующего пневмофиброза, замыкая «порочный круг» клинической прогрессии бронхолегочной недостаточности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях туберкулеза макрофаги представляют ключевую клеточную популяцию, определяющую не только первичное взаимодействие с *M. tuberculosis*, но и дальнейший каскад патологических реакций, приводящих ко вторичной иммунологической недостаточности, а также неконтролируемой деструкции легочной паренхимы и диссеминации процесса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. World Health Organization. Global Tuberculosis report. 2017.
2. Cliff J.M., Kaufmann S.H., McShane H., van Helden P., O'Garra A. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood. *Immunol. Rev.* 2015; 264 (1): 88–102.
3. Ziuzia Iu.R., Zimina V.N., Al'varesFigeroa M.V., Parkhomenko Iu.G., Dolgova E.A. The morphological characteristics of HIV-associated tuberculosis in relation to blood CD4⁺ lymphocyte counts. *Arkh. Patol.* 2014; Sept.-Oct.; 76 (5): 33–37.
4. Bhattacharya D., Danaviah S., Muema D.M., Akilimali N.A., Moodley P., Ndung'u T., Das G. Cellular architecture of spinal granulomas and the immunological response in tuberculosis patients coinfecting with HIV. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1120. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01120.
5. Huygen K. The immunodominant T-cell epitopes of the mycolyl-transferases of the antigen 85 complex of *M. tuberculosis*. *Front. Immunol.* 2014; 5: 1–11.
6. Jasenosky L.D., Scriba T.J., Hanekom W.A., Goldfeld A.E. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunol. Rev.* 2015; 264: 74–87. pmid: 25703553.

7. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *Front. Immunol.* 2014; 6: 13. Published 2014 Mar. 3. DOI: 10.12703/P6-13.
8. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* 2014; 5: 514. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00514.
9. Serena Y.S. Tan, Mark A. Developmental origin of lung macrophage diversity. *Krasnow Development.* 2016; 143: 1318–1327. DOI: 10.1242/dev.129122.
10. Dorhoi A., Kaufmann S.H. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. *Semin. Immunopathol.* 2016; Mar.; 38 (2): 153–166. Epub. 2015, Oct. 5.
11. Янин В.А., Бондаренко О.М., Сазонова Н.А. Методы исследования в цитологии и гистологии: учебно-методическое пособие. Ханты-Мансийск: БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 2015: 65. [Yanin V.L., Bondarenko O.M., Sazonova N.A. Methods of research in cytology and histology: teaching guide. Khanty-Mansiysk: BU "Khanty-Mansiysk State Medical Academy" Publ., 2015: 65 (in Russ.).]
12. Kim P.S., Makhene M., Sizemore C., Hafner R. Viewpoint: Challenges and opportunities in tuberculosis research. *J. Infect. Dis.* 2012; 205 Suppl. 2: 347–352.
13. Lyadova I.V., Pantelev A.V. Th1 and Th17 cells in tuberculosis: protection, pathology, and biomarkers. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 8545–8507.
14. Aryanpur M., Mortaz E., Masjedi M.R., Tabarsi P., Garssen J., Adcock I.M., Mozafarian A. and Sharifi H. Reduced phagocytic capacity of blood monocyte/macrophages in tuberculosis patients is further reduced by smoking. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology.* 2016; 15 (3): 174–182.
15. Yakar H.I., Gunen H., Pehlivan E., Aydogan S. The role of tuberculosis in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2017; 12: 323–329. DOI: 10.2147/COPD.S116086.
16. Kim H.J., Baek S., Kim H.J. The impact of smoking on airflow limitation in subjects with history of asthma and inactive tuberculosis. *PLoS One.* 2015; 10 (4). DOI: 10.1371/journal.pone.0125020.
17. Chistiakov D.A., Killingsworth M.C., Myasoedova V.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation.* 2017; 97: 4–13.
18. Gordon S., Plüddemann A., Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol. Rev.* 2014; 262: 36–55.
19. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs functional differentiation. *Front. Immunol.* 2014; 5: 514. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00514.
20. Chávez-Galán L., Olleros M.L., Vesin D., Garcia I. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169(+) and TCR(+) macrophages. *Front. Immunol.* 2015; 6: 263. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00263.
21. Голубинская Е.П., Филоненко Т.Г., Кальфа М.А., Ермола Ю.А. Морфологические особенности ангиогенеза при фиброзно-кавернозном туберкулезе. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* 2018; 8 (1): 16–19. [Golubinskaya E.P., Filonenko T.G., Kalfa M.A., Ermola Yu. A. Morphological features of angiogenesis in fibrous cavernous pulmonary tuberculosis. *Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2018; 8 (1): 16–19 (in Russ.).]
22. Голубинская Е.П., Крамарь Т.В. Морфофункциональное обоснование таргетной терапии блокаторами ангиогенеза при фиброзно-кавернозном туберкулезе. Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 2018, май 23–25; Москва, Россия: 400–402. [Golubinskaya E.P., Kramar T.V. Morphofunctional substantiation of targeted therapy with blockers of angiogenesis in fibrous cavernous pulmonary tuberculosis. Materials of the international forum "Biotechnology: state and prospects of development". 2018, May 23–25; Moscow, Russia: 400–402 (in Russ.).]

Вклад авторов

Голубинская Е.П. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, написание рукописи статьи. Филоненко Т.Г. – проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи статьи. Кубышкин А.В. – окончательное утверждение рукописи статьи для публикации, общее руководство. Ермола Ю.А. – анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование рукописи статьи. Кальфа М.А. – статистическая обработка результатов и их интерпретация, забор биоматериала, написание рукописи статьи. Герашенко А.В. – забор биоматериала, проведение морфометрического исследования, анализ и интерпретация полученных результатов. Крамарь Т.В. – проведение морфометрического исследования, оформление рукописи статьи.

Authors contribution

Golubinskaya E.P. – conception and design of the research, analysis and interpretation of the research results, drafting of the manuscript. Filonenko T.G. – critical revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript. Kubyshev A.V. – final approval of the manuscript for publication, general guidance. Yermola Yu.A. – analysis and interpretation of the research results, editing of the manuscript. Kalfa M.A. – statistical processing of the results and their interpretation, sampling of biomaterial, drafting of the manuscript. Gerashchenko A.V. – sampling of biomaterial, carrying out of morphometric research, analysis and interpretation of the obtained results. Kramar T.V. – carrying out of the morphometric research, design and drafting of the manuscript.

Сведения об авторах

Голубинская Елена Петровна, канд. мед. наук, доцент, кафедра патологической анатомии с секционным курсом, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0003-3917-924X.

Филоненко Татьяна Григорьевна, канд. мед. наук, доцент, кафедра патологической анатомии с секционным курсом, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0002-4674-7391.

Кубышкин Анатолий Владимирович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0002-1309-4005.

Ермола Юлианна Аркадьевна, канд. мед. наук, доцент, кафедра патологической анатомии с секционным курсом, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0003-4474-3714.

Кальфа Маргарита Алексеевна, ассистент, кафедра патологической анатомии с секционным курсом, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0002-7179-3402.

Геращенко Алина Витальевна, ассистент, кафедра патологической анатомии с секционным курсом, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0001-5076-2570.

Крамарь Татьяна Вадимовна, студент, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0003-2632-0451.

(✉) Голубинская Елена Петровна, e-mail: missive@mail.ru.

Поступила в редакцию 05.11.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Authors information

Golubinskaya Elena P., PhD, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy with Sectional Course, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, the Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3917-924X.

Filonenko Tatyana G., PhD, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy with Sectional Course, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4674-7391.

Kubyshkin Anatoly V., DM, Professor, Head of the General and Clinical Pathophysiology Department, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1309-4005.

YermolaYulianna A., PhD, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy with Sectional Course, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-4474-3714.

Kalfa Margarita A., Assistant, Department of Pathological Anatomy with Sectional Course, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7179-3402.

Gerashenko Alina V., Assistant, Department of Pathological Anatomy with Sectional Course, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5076-2570.

Kramar Tatyana V., Student, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2632-0451.

(✉) Golubinskaya Elena P., e-mail: missive@mail.ru.

Received 05.11.2018
Accepted 17.12.2018

Роль эпителиальных клеток в патогенезе атопии

Казимирский А.Н.¹, Салмаси Ж.М.¹, Порядин Г.В.¹, Свитич О.А.¹,
Брагвадзе Б.Г.¹, Алексеева А.А.², Ганковская Л.В.¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет (РГИМУ) имени Н.И. Пирогова
Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

² Национальный научно-практический центр здоровья детей (ННПЦЗД)
Россия, 117997, г. Москва, Ломоносовский пр., 2/1

РЕЗЮМЕ

Цель. Исследование механизмов развития атопии и построение модели иммунопатогенеза atopических заболеваний.

Материалы и методы. Определение поверхностных рецепторов лимфоцитов периферической крови у больных atopической бронхиальной астмой и atopическим дерматитом с помощью моноклональных антител методом непрямой иммунофлуоресценции. Также у больных atopической бронхиальной астмой с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени оценивали экспрессию генов, кодирующих toll-подобные рецепторы (TLRs) TLR2, TLR4 и TLR9 клетками воздухоносного эпителия, а методом иммуноферментного анализа определяли содержание цитокинов TSLP, IL-33, IL-4 и TGFβ (eBioscience) в смывах с воздухоносных путей.

Результаты. При обострении atopических заболеваний в лимфоцитах периферической крови развивается интенсивный активационный процесс с нарушением активационного апоптоза лимфоцитов, направленный на образование плазматических клеток, способных развивать интенсивный синтез IgE. Для поиска сигналов, которые могли бы объяснить механизм перестройки В-клеточного звена иммунной системы при атопии, исследовали клетки эпителия воздухоносных путей у группы больных atopической бронхиальной астмой и обнаружили увеличение экспрессии генов, кодирующих TLR2, TLR4, TLR9 в 6,3 и 2,5 раза соответственно. Вместе с повышенной экспрессией генов TLRs у больных с бронхиальной астмой выявлено повышенное содержание цитокинов TSLP и IL-33, секретируемых эпителиальными клетками воздухоносных путей. Эти цитокины обладают иммунорегуляторным действием – активируют антигенпрезентирующие функции, формируют Th2-тип иммунного ответа, способствуют выработке цитокинов (IL-4, IL-9, IL-13) и обуславливают развитие аллергического типа воспаления.

Заключение. Мы предполагаем, что основным звеном патогенеза atopических заболеваний является нарушение взаимодействия TLRs с соответствующими лигандами, вызванное спонтанной димеризацией TLRs под влиянием малонового диальдегида. Поступление медленно метаболизирующихся димеров TLRs в клетки эпителия является сигналом для активации генома, что ведет к синтезу аллергических цитокинов IL-33 и TSLP.

Таким образом, главный путь иммунопатогенеза atopических заболеваний представляет патологическое функциональное взаимодействие эпителиальных клеток и В-лимфоцитов периферической крови.

Ключевые слова: атопия, TLRs, IL-33, TSLP, CD-антигены.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

✉ Казимирский Александр Николаевич, e-mail: alnica10@mail.ru.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол № 178 от 22.10.2018 г.).

Благодарности. Авторы выражают свою признательность в работе проректору по научной работе РНИМУ им. Н.И. Пирогова Денису Владимировичу Ребрикову за поддержку настоящего исследования и методическую помощь.

Для цитирования: Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Свитич О.А., Брагвадзе Б.Г., Алексеева А.А., Ганковская Л.В. Роль эпителиальных клеток в патогенезе атопии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 201–210. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-201-210>.

УДК 616.5-002.2-056.43-092:611.018.7

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-201-210>

The role of epithelial cells in atopy pathogenesis

Kazimirsky A.N.¹, Salmasi J.M.¹, Poryadin G.V.¹, Svitich O.A.¹,
Bragvadze B.G.¹, Alekseeva A.A.², Gankovskaya L.V.¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU)

1, Ocrovityuninov Str., Moscow, 117997, Russian Federation

² National Scientific and Practical Center of Children's Health (NSPCCH)

2/1, Lomonosovskiy Av., Moscow, 117997, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. The study of the mechanisms of atopic disease formation and a model of immunopathogenesis of the atopic diseases.

Methods. Determination of surface lymphocytes receptors in peripheral blood of atopic bronchial asthma and atopic dermatitis patients with the help of monoclonal antibodies using the indirect immunofluorescence method. Expression of genes encoding TLR2, TLR4 and TLR9 receptors of airborne epithelial cells by real-time polymerase chain reaction, as well as determination of cytokine TSLP, IL-33, IL-4 and TGFβ (eBioscience) in airway flushes in atopic asthma patients and healthy people.

Results. During the exacerbation of atopic diseases in peripheral blood lymphocytes, an intensive activation process develops with impaired lymphocytes activating apoptosis aimed at the formation of plasma cells capable of developing intensive IgE synthesis. To search for signals that could explain the mechanism of rearrangement of the B-cell part of the immune system during atopy, the epithelium cells of the airways were examined in a group of patients with atopic asthma and found an increase in gene expression coding for TLR2, TLR4, TLR9 in 6, 3 and 2.5 times respectively. Along with increased expression of TLRs genes in patients with bronchial asthma, an increased content of TSLP and IL-33 cytokines secreted by epithelial cells of the airways was detected. These cytokines have an immunoregulatory action - their nearby antigen presenting functions format the Th2 type of immune response, promote the production of cytokines (IL-4, IL-9, IL-13) and cause the development of an allergic type of inflammation.

Conclusion. We suppose that the main link in pathogenesis is a disruption of the interaction of TLRs with the corresponding ligands caused by spontaneous dimerization of TLRs under the malonic dialdehyde influence. The intake of slowly metabolized dimers of TLRs into epithelial cells is a signal for genome activation, which leads to the synthesis of allergic cytokines IL-33 and TSLP. Thus, the main immunopathogenesis pathway of atopic diseases is the pathological functional interaction between epithelial cells and peripheral blood B-lymphocytes.

Key words: atopy, TLRs, IL-33, TSLP, CD antigens.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee under Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol No. 178 of 22.10.2018).

Acknowledgements. The authors would like to thank Denis V. Rebrikov, Vice-Rector for Science of Pirogov Russian National Research Medical University, for supporting the research and providing methodological assistance in the study.

For citation: Kazimirsky A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Svitich O.A., Bragvadze B.G., Alekseeva A.A., Gankovskaya L.V. The role of epithelial cells in atopy pathogenesis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 201–210. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-201-210>.

ВВЕДЕНИЕ

В исследованиях последних лет получены новые данные о важной роли эпителиальных клеток в развитии атопии. В частности, получены доказательства о недостаточности барьерной функции эпителиальных клеток дыхательных путей у больных с атопической бронхиальной астмой. Эпителий представляет собой активный в иммунологическом отношении слой клеток, способный удалять патогены за счет распознавания их Toll-подобными рецепторами (TLRs), секреции ряда цитокинов, а также влиять на характер активации дендритных клеток и определять направление Th1- или Th2-типов иммунного ответа.

Актуальность исследования иммунопатогенеза атопических заболеваний обосновывается распространенностью аллергических (атопических) заболеваний и их недостаточной изученностью. Полноценные представления в отношении иммунопатогенеза атопии позволят улучшить диагностику и лечение таких заболеваний, как полиноз, атопическая бронхиальная астма, атопический дерматит. Иммунопатогенез атопических заболеваний привлекает внимание исследователей в связи с тем, что нарушения в функционировании иммунной системы у больных вызывают образование плазматических клеток, синтезирующих аллергенспецифический иммуноглобулин (Ig) E. Пусковая роль в аллергическом воспалении, по-видимому, принадлежит TLRs эпителиальных клеток, способных после активации синтезировать проаллергические цитокины: тимусно-стромальный лимфопоэтин (TSLP), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерлейкин (IL) 25 и IL-33 [1]. Построение модели иммунопатогенеза атопии, выявление специфического процесса, характерного только для атопии, требуют учета изменений как в системе врожденного, так и адаптивного иммунитета.

Целью настоящей работы являлось исследование концентрации ответственных за аллергическую форму иммунной реакции цитокинов IL-4, IL-33, TSLP, трансформирующего фактора роста

β (TGF β) в смывах воздухоносных путей и экспрессии генов, кодирующих рецепторы TLR-2, TLR-4, TLR-9, у больных атопической бронхиальной астмой, а также определение специфических изменений субпопуляционного состава лимфоцитов крови у больных атопической бронхиальной астмой и атопическим дерматитом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Больные. Дети – 42 ребенка (14 девочек и 28 мальчиков) в возрасте от 3 до 12 лет (средний возраст $8,1 \pm 3,1$ года) с бронхиальной астмой тяжелой степени, находившихся на лечении в аллергологическом отделении Федерального государственного автономного учреждения «Национальный научно-практический центр здоровья детей» (ФГАУ ННПЦЗД) Министерства здравоохранения Российской Федерации. Перед включением в исследование было получено информированное согласие у родителей пациентов. Критерии включения в исследование: верифицированный диагноз тяжелой бронхиальной астмы, подтвержденный атопический фенотип (положительные кожные пробы, повышение уровня сывороточного IgE. Критерии исключения: наличие на момент исследования вирусной инфекции, острых воспалительных заболеваний, патологии ЛОР-органов. Контрольную группу составили 67 здоровых детей (29 девочек и 38 мальчиков) в возрасте $6,4 \pm 2,8$ лет.

Обследовано 44 взрослых больных атопической бронхиальной астмой (16 мужчин и 28 женщин) 16–60 лет (средний возраст $42,2 \pm 4,3$ года) и 36 взрослых пациентов (9 мужчин и 27 женщин) 16–62 лет (средний возраст $36,5 \pm 4,6$ года) с атопическим дерматитом. Все больные с атопической бронхиальной астмой и атопическим дерматитом были обследованы в период обострения заболевания. Контрольную группу составили 26 здоровых людей (12 мужчин и 14 женщин) 19–56 лет (средний возраст $32,2 \pm 5,4$ года).

Определения экспрессии генов TLR-2, TLR-4, TLR-9. Для определения экспрессии генов TLR-2, TLR-4, TLR-9 использовали метод полимеразной

цепной реакции в режиме реального времени. РНК из соскобов слизистой оболочки выделяли методом аффинной сорбции на частицах силикагеля, используя набор для выделения РНК «АмплиПрайм РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис, Россия). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реактивов для синтеза первой цепи ДНК на матрице РНК интересующего гена. Амплификацию ДНК проводили в присутствии высокочувствительного флуоресцентного красителя двухцепочечной ДНК SYBR Green I и праймеров (Синтол, Россия). Анализ результатов проводили относительным методом измерений по DD_{Ct}, получая результаты в виде относительных единиц RQ (relative quantity), показывающих во сколько раз больше экспрессия исследуемого гена в образце по отношению к гену актина [2].

Определение IL-33, TSLP, IL-4, TGFβ методом иммуноферментного анализа. Использовали смывы со слизистой полости носа пациентов с атопической бронхиальной астмой и здоровых детей в объеме 1 мл. Для определения концентрации IL-33, IL-4 и TGFβ1 в назальных смывах и сыворотке крови применяли наборы для иммуноферментного анализа Human IL-33 Platinum ELISA, Human IL-4 Platinum ELISA, Human TGF beta1 Platinum ELISA (Affymetrix eBioscience, San Diego, CA, США), а также тест-набор Quantikine ELISA Human TSLP Immunoassay (R&D systems, США).

Определение поверхностных рецепторов лимфоцитов периферической крови. Оценку относительного и абсолютного содержания в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD20, CD72, CD38, CD23, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, CD54, CD30, CD178 и мембранный иммуноглобулин (mIg) M, mIgG, проводили методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител (ИКО, Россия). В качестве вспомогательных методов проводили выделение лимфоцитов по методу Воуит в градиенте плотности фиколл-верографина, оценку жизнеспособности лимфоцитов сразу после выделения из крови и подсчета их абсолютного числа в периферической крови.

Статистическую обработку полученных результатов с целью оценки достоверности регистрируемых изменений проводили при большой выборке с помощью t-критерия Стьюдента, при малой выборке с ненормальным распределением, а также при сравнении попарно связанных вариантов применяли непараметрический критерий Вилкоксона – Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для исследования механизма перестройки В-клеточного звена иммунной системы при атопии изучению подвергли клетки эпителия воздухоносных путей у группы больных атопической бронхиальной астмой и обнаружили увеличение экспрессии генов, кодирующих TLR2, TLR4 и TLR9. Так, в группе детей с бронхиальной астмой средней и тяжелой степени выявлено значительное повышение экспрессии гена *TLR2* в 5,6 и 6,5 раз соответственно по сравнению с группой здоровых детей ($p \leq 0,05$). Экспрессия гена *TLR4* увеличивалась в 2,5 раза по сравнению с контролем как в группе больных средней тяжести, так и с тяжелой бронхиальной астмой ($p \leq 0,05$). Экспрессия гена *TLR9* у детей со средней степенью тяжести заболевания и при тяжелой форме бронхиальной астмы в 2,6–2,5 раза превышала показатели контрольной группы ($p \leq 0,05$). Результаты этого раздела исследования показывают, что у больных атопической бронхиальной астмой наблюдается активация экспрессии генов распознающих рецепторов врожденного иммунитета. Полученные результаты сочетаются с данными других исследований. Так, при исследовании мононуклеарных клеток периферической крови у больных бронхиальной астмой обнаружены высокие уровни экспрессии TLR2 и TLR9 [3]. Значительное увеличение экспрессии TLR2 и TLR4 найдено у больных атопическим дерматитом на лимфоцитах периферической крови, при этом высокий уровень экспрессии этих рецепторов сохранялся в течение 4 мес после окончания обострения [4].

Активация наивных В-лимфоцитов зависит от последовательной интеграции двух сигналов: связывания В-клеточного рецептора (BCR) и антигена с последующим взаимодействием В-клеток с хелперными Т-клетками через рецептор-опосредованные контактные взаимодействия. Эти взаимодействия индуцируют начальное деление клеток, но не являются достаточными для обеспечения полноценного выживания и прохождения всех стадий дифференцировки, что приводит к гибели части активированных пролиферирующих В-клеток. Предполагается, что для прохождения всех стадий дифференцировки и превращения наивных В-лимфоцитов в плазматические клетки требуется дополнительная сигнализация. Таким сигналом формирования плазматических клеток является стимуляция через любой из TLRs [5, 6]. Обнаруженное увеличение экспрессии генов распознающих рецепторов врожденного иммунитета TLR2, TLR4 и TLR9 у больных атопической

бронхиальной астмой, а также данные по увеличению экспрессии TLRs при других atopических заболеваниях могут свидетельствовать, на наш взгляд, о повышении чувствительности организма atopических пациентов к молекулам патогенов.

В пределах настоящего исследования определяли цитокины, ответственные за аллергическую форму иммунной реакции, IL-33 и TSLP в смывах воздухоносных путей у больных atopической бронхиальной астмой. Это исследование показало, что содержание цитокинов IL-33 и TSLP, секретируемых эпителиальными клетками воздухоносных путей, было в 2,1 и 2,5 раза выше ($p \leq 0,05$) по сравнению с их контрольным уровнем у здоровых доноров. Так, концентрация IL-33 в пробах, полученных от больных atopической бронхиальной астмой, составляла 42,5 (32,7–82,3) пг/мг белка по сравнению с контрольным уровнем у здоровых доноров 20,04 (11,0–28,5) пг/мг белка ($p < 0,05$). Концентрация TSLP в пробах, полученных от больных детей, была повышенной до 91,7 (84,5–107,9) пг/мг белка по сравнению с 37,2 (25,2–73,6) пг/мг белка в контроле ($p < 0,05$).

Эти цитокины (IL-33 и TSLP) обладают иммунорегуляторным действием – активируют антигенпрезентирующие функции дендритных клеток, формируют Th2-тип иммунного ответа, а также способны активировать ILC2 (врожденные лимфоидные клетки 2-го типа), что ведет к синтезу и секреции цитокинов (IL-4, IL-9, IL-13) и обуславливает развитие аллергического типа воспаления.

Проникая в эпителий дыхательных путей, аллергены и патогены активируют распознающие рецепторы врожденного иммунитета (TLRs), индуцируя секрецию провоспалительных цитокинов и интерферонов (рис. 1). Эпителиальные клетки синтезируют TSLP, IL-33 и IL-25, которые через активацию ILC2 способствуют синтезу цитокинов (IL-4, IL-9, IL-13), инициирующих, в свою очередь, тучные клетки и эозинофилы, и вызывают развитие аллергического типа воспаления. Вместе с этим аллергические эпителиальные цитокины (TSLP и IL-33) активируют способность миелоидных дендритных клеток индуцировать Th2-воспалительный ответ [7].

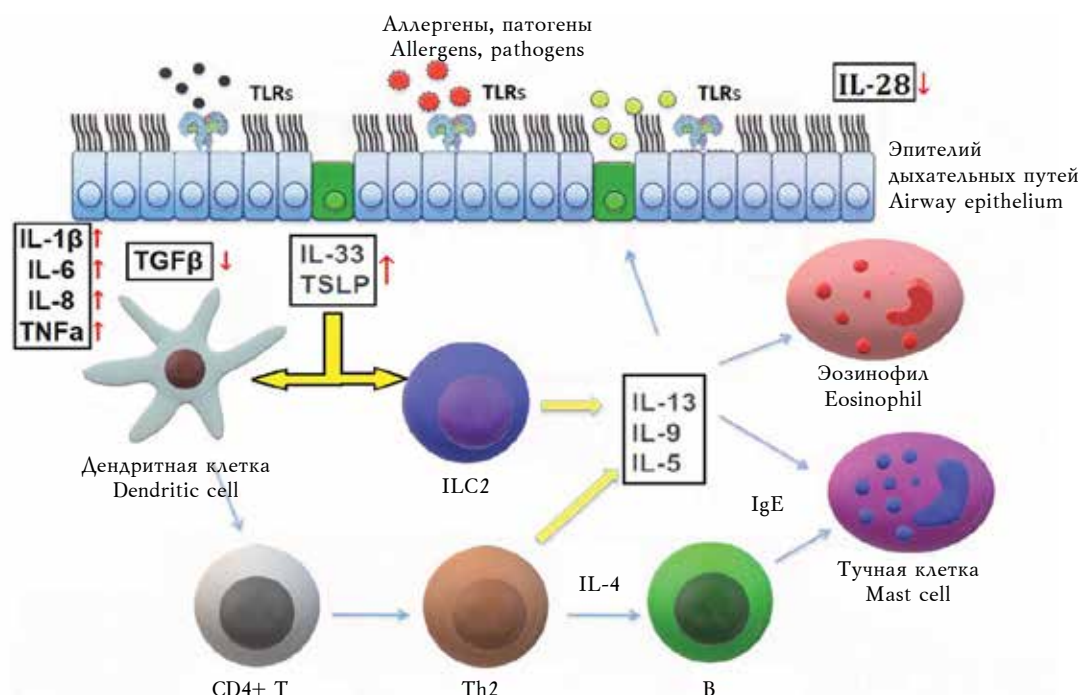


Рис. 1. Схема участия механизмов врожденного иммунитета в патогенезе atopии: ↑ – повышение показателя, ↓ – снижение показателя

Fig. 1. Involvement of innate immunity mechanisms in the pathogenesis of atopii: ↑ – increase in the parameter, ↓ – decrease in the parameter

В исследуемой группе больных также было выявлено 4-кратное увеличение содержания IL-4 до уровня 6,2 (3,3–8,5) пг/мг белка против контрольного уровня у здоровых доноров 1,5

(0,7–2,7), а также существенное снижение уровня TGFβ в 3,2 раза (385,1 (47,7–971,4) пг/мг белка у больных против контроля 2 532,9 (1 687,5–3 175,8) пг/мг белка), блокирующего стимуляцию клеток

иммунной системы и способствующего индукции апоптоза. Полученные данные позволяют заключить, что эпителиальные клетки иммунологически активны и принимают участие как в инициации аллергического процесса, так и в его поддержании. Синтез и секреция аллергических цитокинов клетками эпителия, а также контактные взаимодействия лимфоцитов периферической крови с антигенпрезентирующими клетками создают определенный профиль экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов, что отражается на их популяционном и субпопуляционном составе в периферической крови.

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при обострении атопических заболеваний отражает как общевоспалительные изменения, так и те, которые характерны только для атопии. К числу

иммунных проявлений воспаления любого генеза относят снижение количества Т-лимфоцитов (CD3), повышение количества В-клеток (CD20), увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих молекулу межклеточной коммуникации ICAM-1 (Inter-cellular adhesion molecule 1, или CD54), а также повышение экспрессии ранних активационных антигенов CD23 (на активированных В-лимфоцитах) и CD25 (на активированных Т-лимфоцитах).

Обострение атопических заболеваний (атопической бронхиальной астмы и атопического дерматита) сопровождается значительными изменениями в популяционном и субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови. Наиболее выраженные изменения наблюдаются в субпопуляционном составе В-лимфоцитов (рис. 2).

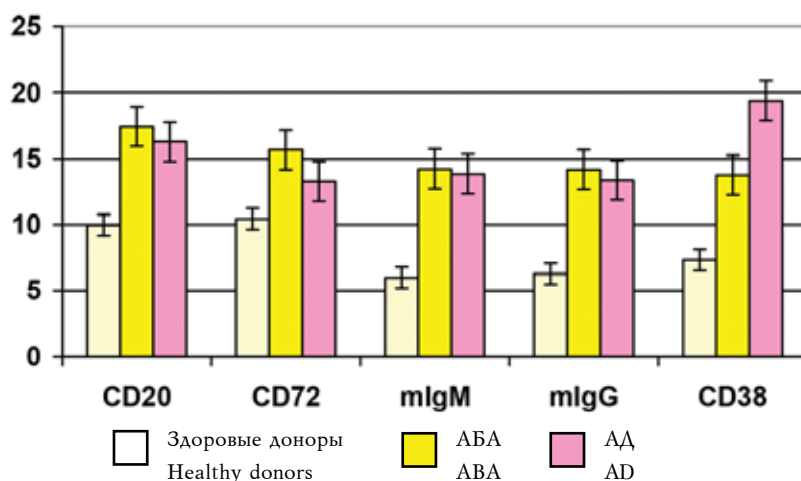


Рис. 2. Субпопуляции В-лимфоцитов у больных атопической бронхиальной астмой и атопическим дерматитом: АБА – атопическая бронхиальная астма, АД – атопический дерматит. По оси ОХ: CD20 – В-лимфоциты; CD72 – В-лимфоциты, примированные антигеном; mIgM – лимфоциты, несущие поверхностный иммуноглобулин М; mIgG – лимфоциты, несущие поверхностный иммуноглобулин G; CD38 – предшественники плазматических клеток. По оси ОУ – относительное количество лимфоцитов периферической крови, %

Fig. 2. Subpopulations of B-lymphocytes in patients with atopic bronchial asthma and atopic dermatitis: ABA – atopic bronchial asthma, AD – atopic dermatitis. At the x-axis: CD20 – B lymphocytes; CD72 – B lymphocytes primed with antigen; mIgM – lymphocytes carrying surface immunoglobulin M; mIgG – lymphocytes carrying surface immunoglobulin G; CD38 are plasma cell precursors. At the y-axis – the relative number of peripheral blood lymphocytes, %

Обнаруживается повышение количества В-лимфоцитов (CD20⁺-клетки), примированных антигеном В-лимфоцитов (CD72⁺-клетки), числа лимфоцитов mIgM⁺ и mIgG⁺, а также предшественников плазматических клеток (CD38⁺-лимфоциты). Приведенные результаты показывают, что атопическая бронхиальная астма и атопический дерматит характеризуются сходными изменениями в численности субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови, что свидетельствует о наличии некоторого общего имму-

нопатологического процесса в организме атопических пациентов [8–10].

Полученные данные (см. рис. 2) демонстрируют, что дифференцировочный процесс в В-лимфоцитах направлен в сторону образования предшественников плазматических клеток (CD38⁺-лимфоциты), количество которых увеличивается до (13,76 ± 0,55)% у больных атопической бронхиальной астмой и (19,40 ± 1,14)% у больных атопическим дерматитом по сравнению с контролем (7,33 ± 0,52)%.

В основе повышения численности всех исследованных популяций В-клеток лежит развернутый активационный процесс, сопровождающийся нарушением активационного апоптоза [10]. Увеличение численности всех исследованных субпопуляций В-лимфоцитов, найденное при обострении atopических заболеваний, свидетельствует о высокой выживаемости В-лимфоцитов в ходе пролиферативного процесса в организме atopических пациентов и направленности дифференцировочного процесса в В-клеточном звене иммунной системы на образование плазматических клеток, способных развивать высокоинтенсивный синтез IgE. Можно обоснованно утверждать, что в В-клеточном звене иммунной системы развиваются два параллельных процесса, вызывающих образование повышенного количества плазматических клеток. В основе увеличенной численности всех исследованных популяций В-лимфоцитов лежит нарушение активационного апоптоза лимфоцитов, а повышение их выживаемости обусловлено высоким уровнем внутриклеточного цАМФ [8, 11]. Механизм нарушения экспрессии рецептора активационного апоптоза в лимфоцитах atopических пациентов не установлен, но можно предполагать, что его причиной является образование определенных микроРНК [12]. Повышение уровня внутриклеточного цАМФ и высокая выживаемость лимфоцитов у больных atopическими заболеваниями могут быть вызваны

также действием аллергических цитокинов IL-4, IL-33, TSLP [13].

Согласно данным, полученным в последнее время, ключевая роль в экспрессии генома, кодирующего аллергические цитокины, принадлежит внутриклеточному белку MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), который участвует в передаче сигнала от TLRs на внутриклеточные структуры. Особенностью белка MyD88 является его высокая скорость обновления. Ингибирование базальной аутофагии в макрофагах увеличивает время жизни MyD88 в цитозоле и вызывает экспрессию генома с последующим синтезом воспалительных цитокинов [14]. Сложные для лизосомального гидролиза антигены вызывают в клетках эпителия активацию генома и синтез аллергических цитокинов. Культивирование эпителиальных клеток T84 с овалбумином, в который ввели дополнительные ковалентные связи с помощью малонового диальдегида (МДА), индуцирует повышенную секрецию этими клетками воспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-25, IL-33, TSLP и TNF α) [15]. На основании этих результатов можно предположить, что запуск секреции клетками эпителия воздухоносных путей аллергических цитокинов обусловлен прямым взаимодействием TLRs эпителия с МДА модифицированными патогенами, собственными белками организма или димеризацией TLRs под влиянием МДА.



Рис. 3. Схема «порочного круга» в клетках бронхиального эпителия: АДМА – асимметричный диметиларгинин, TLRs – toll-like рецепторы

Fig. 3. The “vicious cycle” in the cells of the bronchial epithelium: ADMA – asymmetric dimethylarginine, TLRs – toll-like receptors

Мы предполагаем, что в клетках эпителия действует «порочный круг», ведущий к повышению экспрессии TLRs (см. рис. 3). Первичное воспаление эпителия вызывает повреждение клеток и активацию аутофагии. При этом в клетках эпителия образуется асимметричный диметиларгинин (АДМА). Образование АДМА вызывает снижение активности аргиназы, повышение концентрации внутриклеточного аргинина, увеличение образования оксида азота (NO) и, как следствие, образование токсичного пероксинитрита (NO_3^-), вызывающего дополнительное повреждение слоя эпителиальных клеток. Репаративные процессы в клетках эпителия активируют путь синтеза биогенных полиаминов, в котором из аргинина образуется орнитин, а затем путресцин, спермин и спермидин. Конечный продукт пути синтеза биогенных полиаминов – спермидин – является мощным активатором аутофагии. Этот процесс, с одной стороны, увеличивает синтез клеточных белков и, в том числе, TLRs. С другой стороны, повышается уровень образования АДМА, так как единственный доказанный путь образования этого эндогенного ингибитора аргиназы – гидролиз клеточных белков, в которые включен модифицированный аргинин.

Повышенный уровень аутофагии, найденный при атопических заболеваниях в лимфоцитах и эпителиальных клетках, надо заметить, недостаточен для полноценного гидролиза молекул патогенов. Поэтому приходится признать, что увеличение интенсивности аутофагии в эпителиальных клетках при ее относительной функциональной недостаточности – процесс, лежащий в основе атопии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность полученных результатов позволяет сформулировать гипотезу о взаимодействии врожденного и адаптивного иммунитета при воспалении, сопровождающем течение атопических заболеваний.

Первичное повреждение эпителиальных клеток активирует в них аутофагию в течение продолжительного времени, происходит накопление АДМА, ингибирование активности аргиназы и увеличение образования спермидина, являющегося стимулятором аутофагии. Интенсивный процесс аутофагии вызывает увеличение синтеза и экспрессию распознающих рецепторов врожденного иммунитета (TLRs) в клетках эпителия. Конечный продукт перекисного окисления липидов МДА вызывает образование ковалентных связей между субъединицами TLRs, что служит сигна-

лом к интернализации этих рецепторов. Димеры TLRs медленно гидролизуются, и в их внутриклеточной части формируется NF-κB-активирующий комплекс, центральное место в котором занимает белок MyD88. В клетках эпителия главный транскрипционный фактор NF-κB активирует экспрессию генов, кодирующих синтез и секрецию аллергических цитокинов IL-33, TSLP, а также IL-4, регулирующего рост и дифференцировку В-лимфоцитов. Наивные В-лимфоциты быстро превращаются в плазматические клетки, способные развивать высокоинтенсивный синтез IgE после контактных взаимодействий с антигенпрезентирующими клетками и поступления ростостимулирующих сигналов со стороны IL-33, TSLP, а также IL-4.

Описанная модель иммунопатогенеза атопии показывает, что аргиназа и МДА – не только важные эндогенные регуляторы иммунной системы, отвечающие за иммунологическую реактивность, как мы описывали в обзорной статье [16], но и участники функциональной перестройки эпителия при атопии. Таким образом, главный путь иммунопатогенеза атопических заболеваний представляет патологическое функциональное взаимодействие эпителиальных клеток и В-лимфоцитов периферической крови.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hammad H., Chieppa M., Perros F., Willart M.A., Germain R.N., Lambrecht B.N. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* 2009; 15 (4): 410–416. DOI: 10.1038/nm.1946.
2. Ребриков Д.В. (ред.). NSG. Высокопроизводительное секвенирование. М.: БИНОМ, 2014: 234. [Rebrikov D.V. (red.). NSG. High throughput sequencing technologies. Moscow: BINOM Publ., 2014: 234 (in Russ.).]
3. Sánchez-Zaucó N., Del Río-Navarro B., Gallardo-Casas C., Del Río-Chivardi J., Muriel-Vizcaino R., Rivera-Pazos C., Huerta-Yepez S., Cruz-Lopez M., Maldonado-Bernal C. High expression of Toll-like receptors 2 and 9 and Th1/Th2 cytokines profile in obese asthmatic children. *Allergy Asthma Proc.* 2014; 35 (3): 34–41. DOI: 10.2500/aap.2014.35.3749.
4. Tsybikov N.N., Petrisheva I., Fefelova E.V., Kuznik B., Magen E. Expression of TLR2 and TLR4 on peripheral blood monocytes during exacerbation of atopic dermatitis. *Allergy Asthma Proc.* 2015; 36 (6): e140–145. DOI: 10.2500/aap.2015.36.3901.
5. Ruprecht C.R., Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36 (4): 810–816.
6. Manjarrez-Orduco N., Moreno-García M.E., Fink K., Santos-Argumedo L. CD38 cross-linking enhances

- TLR-induced B cell proliferation but decreases IgM plasma cell differentiation. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37 (2): 358–367.
7. Cayrol C., Girard J.P. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 2014; 31: 31–37. DOI: 10.1016/j.coi.2014.09.004.
 8. Poryadin G.V., Zhuravleva N.E., Salmasi J.M., Kazimirsky A.N., Semenova L.Y., Polner S.A., Chervinskaya T.A. Immunological mechanisms of recovery from an acute stage in patients with atopic bronchial asthma. *Russ. J. Immunol.* 2002; 7 (3): 259–264 (in Russ.).
 9. Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Алиева З.О., Казимирский А.Н. Характеристика поверхностных рецепторов лимфоцитов крови больных atopическим дерматитом. *Аллергология и иммунология.* 2004; 5 (1) 54–70. [Salmasi Zh.M., Poryadin G.V., Aliyeva Z.O., Kazimirsky A.N. Features of the surface receptors of blood lymphocytes in patients with atopic dermatitis. *Allergologiya i immunologiya.* 2004; 5 (1): 54–70 (in Russ.)].
 10. Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Семенова Л.Ю. Иммунопатогенез формирования atopических заболеваний. *Бюллетень сибирской медицины.* 2017; 16 (4): 233–241. [Poryadin G.V. Salmasi Zh.M. Kazimirsky A.N. Semenova L.Yu. Immunopathogenesis of the formation of atopical diseases. *Bulletin Siberian Medicine.* 2017; 16 (4) 233–241 (in Russ.)].
 11. Polumuri S.K., Jayakar G.G., Shirey K.A., Roberts Z.J., Perkins D.J., Pitha P.M., Vogel S.N. Transcriptional regulation of murine IL-33 by TLR and non-TLR agonists. *J. Immunol.* 2012; 189 (1): 50–60. DOI: 10.4049/jimmunol.1003554.
 12. Li B., Sun M., Gao F., Liu W., Yang Y., Liu H., Cheng Y., Liu C., Cai J. Up-regulated expression of miR-23a/b targeted the pro-apoptotic Fas in radiation-induced thymic lymphoma. *Cell Physiol. Biochem.* 2013; 32 (6): 1729–1740. DOI: 10.1159/000356607.
 13. Futamura K., Orihara K., Hashimoto N., Morita H., Fukuda S., Sagara H., Matsumoto K., Tomita Y., Saito H., Matsuda A. beta2-Adrenoceptor agonists enhance cytokine-induced release of thymic stromal lymphopoietin by lung tissue cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2010; 152 (4): 353–361. DOI: 10.1159/000288288.
 14. Into T., Horie T., Inomata M., Gohda J., Inoue J.I., Murakami Y., Niida S. Basal autophagy prevents auto-activation or enhancement of inflammatory signals by targeting monomeric MyD88. *Sci. Rep.* 2017; Apr. 21, 7 (1): 1009. DOI: 10.1038/s41598-017-01246-w.
 15. Nikolić J., Nešić A., Čavić M., Đorđević N., Anđelković U., Atanasković-Marković M., Drakulić B., Gavrović-Jankulović M. Effect of malondialdehyde on the ovalbumin structure and its interactions with T84 epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2017; Feb. 1861 (2): 126–134. DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.11.021.
 16. Kazimirskii A.N., Poryadin G.V., Salmasi Z.M., Semenova L.Y. Endogenous Regulators of the Immune System (sCD100, Malonic Dialdehyde, and Arginase). *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018; Mar. 164 (5): 693–700. DOI: 10.1007/s10517-018-4061-6.

Вклад авторов

Казимирский А.Н. – определение экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител (ИКО). Выделение лимфоцитов в градиенте плотности фикола-верографина, оценка жизнеспособности лимфоцитов после выделения их из крови. Выявление общевоспалительных изменений в экспрессии CD-антигенов и формулирование концепции atopии. Салмаси Ж.М. – определение экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител. Выделение лимфоцитов в градиенте плотности фикола-верографина, оценка жизнеспособности лимфоцитов после выделения их из крови. Выявление изменений в экспрессии CD-антигенов, характерных только для atopии, и формулирование концепции исследования. Порядин Г.В. – выявление неспецифических изменений в популяционном и субпопуляционном составе лимфоцитов крови, характерных для любых видов воспаления, и определение специфических изменений, характерных для atopии. Формулирование общей концепции atopии. Свитич О.А. – описание результатов по экспрессии генов *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9*. Брагвадзе Б.Г. – постановка полимеразной цепной реакции в режиме реального

Authors contribution

Kazimirsky A.N. – determination of the expression of surface receptors on lymphocytes by indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies (IKO, Russia). Isolation of lymphocytes in ficoll-verografin density gradient, evaluation of lymphocyte viability after their isolation from blood. Detection of inflammatory changes in CD antigen expression and formulation of the concept of atopy. Salmasi Zh.M. – determination of the expression of surface receptors on lymphocytes by indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies. Isolation of lymphocytes in ficoll-verografin density gradient, evaluation of lymphocyte viability after their isolation from blood. Detection of inflammatory changes in CD antigen expression that are typical of atopy only and formulation of the research concept. Poryadin G.V. – identification of nonspecific changes in the population and subpopulation composition of blood lymphocytes, characteristic of any types of inflammation, and the definition of specific changes characteristic of atopy. Formulation of the general concept of atopy. Svitich O.A. – a description of the results on the expression of *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* genes. Bragvadze B.G. – production of polymerase chain reaction in real time to determine the expression of *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* genes and enzyme immunoassay to

времени для определения экспрессии генов *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* и иммуноферментного анализа для определения концентрации цитокинов. Алексеева А.А. – подбор пациентов с бронхиальной астмой и здоровых доноров, их клиническая характеристика. Ганковская Л.В. – анализ результатов по определению цитокинов и разработка общей концепции исследования.

determine the concentration of cytokines. Alekseeva A.A. – selection of patients with asthma and healthy donors, their clinical characteristics. Gankovskaya L.V. – analysis of the results on the determination of cytokines and the development of a general research concept.

Сведения об авторах

Казимирский Александр Николаевич, д-р биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник, отдел молекулярных технологий, РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва. ORCID iD 0000-0002-3079-4089.

Салмаси Жан Мустафаевич, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии, РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва. ORCID iD 0000-001-8524-0019.

Порядин Геннадий Васильевич, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии, РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-2010-3296.

Свитич Оксана Анатольевна, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, кафедра иммунологии, РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-1757-8389.

Брагвадзе Белла Гелаевна, ассистент, кафедра иммунологии, РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-0870-6000.

Алексеева Анна Александровна, канд. мед. наук, зав. отделением восстановительного лечения детей с аллергическими болезнями и заболеваниями органов дыхания, ННП ЦЗД, г. Москва.

Ганковская Людмила Викторовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой иммунологии, РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-1271-3078.

(✉) Казимирский Александр Николаевич, e-mail: alnica10@mail.ru.

Authors information

Kazimirsky Alexander N., Associate Professor, DBSc, Leading Researcher, Department of Molecular Technologies, RNRMU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-3079-4089.

Salmasi Jean M., DM, Professor, Head of the Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, RNRMU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-001-8524-0019.

Poryadin Gennady V., DM, Professor, Corresponding Member of Russian Academy Science, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, RNRMU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2010-3296.

Svitich Oksana A., DM, Professor, Corresponding Member of Russian Academy Science, Department of Immunology, RNRMU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1757-8389.

Bragvadze Bella G., Assistant, Department of Immunology, RNRMU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0870-6000.

Alekseeva Anna A., PhD, Head of the Department of Rehabilitation Treatment of Children with Allergic and Respiratory Diseases, NSPCCH, Moscow, Russian Federation.

Gankovskaya Lyudmila V., DM, Professor, Head of the Department of Immunology, RNRMU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1271-3078.

(✉) Kazimirsky Alexander N., e-mail: alnica10@mail.ru

Поступила в редакцию 07.10.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Received 07.10.2018

Accepted 17.12.2018

VEGF- и EGF-опосредованная кооперация эозинофильных гранулоцитов и опухолевых клеток при раке желудка и толстого кишечника

Колобовникова Ю.В.¹, Янкович К.И.^{1,2}, Романова Е.В.¹, Дмитриева А.И.²,
Уразова О.И.^{1,3}, Новицкий В.В.^{1,3}, Полетика В.С.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Томский областной онкологический диспансер (ТООД)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 115

³ Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники (ТУСУР)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 40

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – проанализировать секрецию сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) и эпидермального ростового фактора (EGF) эозинофильными гранулоцитами крови *in vitro* и экспрессию рецепторов VEGFR и EGFR в опухолевой ткани при раке желудка и толстого кишечника в ассоциации с тканевой эозинофилией.

Материалы и методы. Обследовано 52 пациента с раком желудка и 50 пациентов с раком толстого кишечника. Материалом исследования служили супернатанты суспензионной культуры эозинофильных гранулоцитов и образцы тканей злокачественных новообразований желудка и толстого кишечника. Методом иммуноферментного анализа определяли содержание VEGF и EGF в супернатантах культуры эозинофильных гранулоцитов *in vitro*. Экспрессию VEGFR и EGFR в опухолевой ткани оценивали методом иммуногистохимии. Полученные результаты анализировали статистическими методами.

Результаты. Установлено увеличение базальной и индуцированной рекомбинантным интерлейкином (г-IL) 5 секреции VEGF эозинофильными гранулоцитами крови *in vitro* у больных раком желудка, сопровождающимся тканевой эозинофилией. Концентрация EGF в культуре эозинофилов крови *in vitro* при добавлении г-IL-5 повышалась у больных с эозинофильной инфильтрацией опухолевой ткани вне зависимости от локализации патологического процесса как у больных с раком желудка, так и с раком толстого кишечника. Эозинофильная инфильтрация опухолевой ткани при раке желудка и раке толстого кишечника сочеталась с гипоекспрессией опухолевыми клетками EGFR; экспрессия рецептора VEGFR не зависела от присутствия эозинофильных гранулоцитов в ткани опухолей.

Заключение. Гиперсекреция сосудисто-эндотелиального фактора роста VEGF и эпидермального ростового фактора EGF (при индукции г-IL-5) эозинофилами крови *in vitro* у больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией свидетельствует о повышении активности этих клеток. Дефицит экспрессии в опухолевой ткани рецепторов VEGFR и EGFR обуславливает нарушение кооперативного взаимодействия эозинофильных гранулоцитов и опухолевых клеток при злокачественных новообразованиях желудка и толстого кишечника.

Ключевые слова: эозинофил, ростовые факторы, рецепторы, рак желудка, рак толстого кишечника.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МД-842.2017.7) и ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 5309 от 22.05.2017 г.).

Для цитирования: Колобовникова Ю.В., Янкович К.И., Романова Е.В., Дмитриева А.И., Уразова О.И., Новицкий В.В., Полетика В.С. VEGF- и EGF-опосредованная кооперация эозинофильных гранулоцитов и опухолевых клеток при раке желудка и толстого кишечника. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 211–219. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-211-219>.

УДК 616.33/.345-006.6-091.8

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-211-219>

VEGF-and EGF-mediated cooperation of eosinophilic granulocytes and tumor cells in gastric and colon cancer

Kolobovnikova Yu.V.¹, Yankovich K.I.^{1,2}, Romanova E.V.¹, Dmitrieva A.I.², Urazova O.I.^{1,3}, Novitskiy V.V.^{1,3}, Poletika V.S.¹

¹ Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634055, Russian Federation

² Tomsk Regional Oncological Dispensary (TROD)
115, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

³ Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics (TUSUR)
40, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Aim of the research – to analyze secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor (EGF) by blood eosinophilic granulocytes *in vitro*, together with an expression of VEGFR and EGFR in tumor tissue in gastric and colon cancer in association with tissue eosinophilia.

Materials and methods. A total of 52 patients with gastric cancer and 50 patients with colon cancer were examined. The material of the research included supernatants of eosinophil cultures and samples of malignant tumors tissues of the stomach and colon. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the contents of VEGF and EGF in the eosinophil culture supernatants *in vitro*. The expression of VEGFR and EGFR in tumor tissue was evaluated by immunohistochemistry. The results were analyzed by statistical methods.

Results. An increase in basal and r-IL-5-induced secretion of VEGF by eosinophilic granulocytes of blood *in vitro* was found in patients with gastric cancer accompanied by tissue eosinophilia. The concentration of EGF in the culture of blood eosinophils *in vitro* with the addition of r-IL-5 increased in patients with eosinophilic infiltration of tumor tissue, regardless of the localization of the pathological process, both in patients with gastric cancer and colon cancer. Eosinophilic infiltration of the tumor tissue in gastric cancer and colon cancer was combined with hypo-expression of EGFR by tumor cells; VEGFR receptor expression was not dependent on the presence of eosinophilic granulocytes in the tissue of tumors.

Conclusion. Hypersecretion of vascular endothelial growth factor VEGF and epidermal growth factor EGF (upon stimulation with r-IL-5) by blood eosinophils *in vitro* in patients with gastric and colon cancer with tissue eosinophilia indicates an increase in the activity of these cells. Deficiency of expression of VEGF and EGFR receptors in tumor tissue causes violation of cooperative interaction of eosinophilic granulocytes and tumor cells in malignant tumors of the stomach and large intestine.

Key words: eosinophil, growth factors, growth factor receptors, gastric cancer, colon cancer.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out with the financial support of the Council on grants of the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists (MD-842.2017.7) and leading scientific schools (NSH-2690.2018.7).

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee under SSMU (Protocol No. 5309 of 22.05.2017).

For citation: Kolobovnikova Yu.V., Yankovich K.I., Romanova E.V., Dmitrieva A.I., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Poletika V.S. VEGF-and EGF-mediated cooperation of eosinophilic granulocytes and tumor cells in gastric and colon cancer. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 211–219. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-211-219>.

ВВЕДЕНИЕ

Опухолевое микроокружение (совокупность элементов стромы и клеток) в значительной степени определяет рост и прогрессию опухоли [1]. Регуляторное влияние клеток микроокружения может быть направлено на поддержание равновесия между резистентными и чувствительными клонами, обеспечение условий для «дремлющего» состояния опухоли [2]. Роль эозинофила как элемента опухолевого микроокружения рассматривается неоднозначно. В литературе превалирует мнение о противоопухолевом цитотоксическом потенциале эозинофильных гранулоцитов [3–5]. Вместе с тем зарубежными авторами подробно описаны рецепторы и широкий спектр гуморальных факторов, посредством которых эозинофилы могут участвовать в механизмах развития опухолей [6].

Эозинофильные гранулоциты секретируют сосудисто-эндотелиальный фактор (vascular endothelial growth factor (VEGF)) и эпидермальный ростовой фактор (epidermal growth factor (EGF)). Подобно гормонам, эти факторы обладают плеiotропностью биологического действия и способны оказывать разного рода рецептор-зависимые эффекты на многие клетки – стимулировать или ингибировать их деление, хемотаксис, созревание. Доказана их роль в патогенезе опухолевой прогрессии [7, 8]. Взаимодействие EGF со своим рецептором активирует синтез белков и пролиферацию опухолевых клеток [9]. При действии VEGF образуются новые кровеносные и лимфатические сосуды, опосредующие формирование метастазов опухоли [10]. Высокая экспрессия рецепторов к VEGF и EGF (VEGFR и EGFR) в опухолевой ткани диагностируется при злокачественных новообразованиях различных гистологических типов и локализаций, что может быть негативным критерием их прогноза [11].

Предполагается, что эозинофильные гранулоциты в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника могут влиять на трансформированные клетки посредством продукции ростовых пептидов, обеспечивающих самоподдержание, гиперпролиферацию и инвазивный рост опухоли, а также усиливающих процессы формирования в ней локальной сосудистой сети. Изучение механизмов межклеточной кооперации эозинофилов и опухолевых клеток позволит существенно дополнить современные представления о роли тканевой эозинофилии в патогенезе рака желудка и толстого кишечника.

Цель настоящего исследования – изучить особенности секреции ростовых факторов (VEGF и EGF) эозинофильными гранулоцитами крови *in vitro* и проанализировать экспрессию соответствующих рецепторов в опухолевой ткани у больных раком желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией и без нее.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии СибГМУ (заведующий – д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН О.И. Уразова) и на базе патологоанатомического отделения ТООД (заведующий – д-р мед. наук И.А. Пурлик). В исследование были включены 52 пациента с диагнозом рака желудка и 50 пациентов с диагнозом рака толстого кишечника (C18-C20), состоящих на диспансерном учете и проходивших лечение в ТООД (главный врач – С.В. Мазеина). Все пациенты были обследованы и прооперированы до назначения им специфической лучевой и лекарственной терапии. Диагноз рака желудка и рака толстого кишечника в каждом случае подтверждался результатами оценки клинического статуса пациентов и дан-

ных морфологического исследования. Пациенты с раком желудка и раком толстого кишечника были разделены на подгруппы в зависимости от наличия эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани. В исследование вошли 25 пациентов со злокачественными новообразованиями желудка (средний возраст $(65,3 \pm 4,7)$ лет), в опухолевой ткани которых регистрировалась эозинофилия; 27 пациентов с раком желудка без эозинофилии (средний возраст $(62,9 \pm 5,2)$ лет); 23 человека (средний возраст $(63,0 \pm 7,3)$ лет) с диагнозом рака толстого кишечника, ассоциированного с тканевой эозинофилией; 32 пациента (средний возраст $(61,3 \pm 6,0)$ лет) с раком толстого кишечника, в опухолевой ткани которых не встречались эозинофилы.

В исследование не были включены пациенты, которым проводили предоперационную лучевую терапию и химиотерапию, а также пациенты с опухолями других локализаций, обострением хронических аллергических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний. Группу контроля составили 36 здоровых доноров – 22 мужчины и 14 женщин (средний возраст $(57,1 \pm 3,3)$ лет).

Материалом исследования служили образцы тканей злокачественных опухолей желудка и толстого кишечника, супернатанты суспензионной культуры эозинофильных гранулоцитов. Исследование экспрессии рецепторов к фактору роста эндотелия сосудов (VEGFR) и эпидермальному ростовому фактору (EGFR) в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника проводили иммуногистохимическим методом по стандартной методике [12] с использованием автоматического иммуногистостейнера Bond-maX (Leica Biosystems, Германия). В исследовании использовали антитела фирмы Novocastra (Leica Biosystems, Германия) к VEGFR – клон KLT9, рабочее разведение 1 : 100, мышинные и EGFR – клон EGFR.25, RTU, мышинные. Анализ экспрессии в опухолевой ткани VEGFR и EGFR включал оценку относительного количества опухолевых клеток, имеющих на мембране указанные рецепторы [13, 14]. Производили подсчет не менее 300 клеток в областях с максимальной экспрессией рецептора.

Выделение эозинофильных гранулоцитов из цельной крови (взятой из локтевой вены утром натощак в количестве 20 мл) выполняли на градиенте плотности ficoll – раque ($p = 1,077$ г/мл) с применением Eosinophil isolation kit (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) методом иммуномагнитной сепарации. Для стимуляции цитокин-секреторной активности эозинофильных гранулоцитов

крови в пробы вносили 10^{-8} г/мл рекомбинантного интерлейкина (r-IL) 5 (Biosource, Бельгия).

Концентрацию факторов роста VEGF и EGF в супернатантах суспензионных культур эозинофильных гранулоцитов измеряли иммуноферментным методом по протоколам фирмы-производителя тест-систем (RayBio, США). Оптическую плотность оценивали на фотометре-анализаторе Multiscan EX (Финляндия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программы Statistica for Windows Version 8.0 (StatSoft Inc., США). Для проверки соответствия выборочных данных нормальному распределению применяли критерий Шапиро – Уилка. Количественные признаки в группах сравнения представляли в виде среднего значения M и стандартного квадратичного отклонения σ , а также медианы, верхнего (75%) и нижнего (25%) квартилей ($Me (Q_1 - Q_3)$). Достоверность различий независимых выборок, распределение которых не соответствовало распределению Гаусса, оценивали с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни (U). Для проверки гипотезы о равенстве средних выборочных величин применяли однофакторный дисперсионный анализ (F -критерий). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основу патогенеза опухолевых заболеваний составляет кооперативное взаимодействие трансформированных клеток с элементами опухолевого микроокружения. Взаимное регуляторное влияние клеток внутри опухоли может быть обусловлено секрецией ростовых факторов и экспрессией их рецепторов. Сигнальные пути фактора роста эндотелия сосудов VEGF и эпидермального ростового фактора EGF имеют важное значение в формировании злокачественных опухолей желудка и толстого кишечника [10, 15, 16].

Источником ростовых факторов могут быть многие клетки опухолевого микроокружения [9, 11, 17]. По данным R. Shamri и соавт. (2010), тканевые эозинофилы способны экспрессировать VEGF при гипоксии в участках некроза опухоли [18]. Другими исследователями продемонстрирована высокая концентрация VEGF в сыворотке крови при раке толстого кишечника, раке молочной железы и почечно-клеточном раке [16, 19]. Высокая экспрессия VEGF в опухолевой ткани рассматривается в качестве негативного критерия прогноза течения болезни у больных раком легких и раком предстательной железы [20].

В настоящем исследовании у больных раком желудка и раком толстого кишечника мы оценивали секрецию сосудисто-эндотелиального фактора роста VEGF эозинофильными гранулоцитами крови *in vitro* в интактной культуре клеток и при добавлении в культуральную суспензию r-IL-5. Установлено, что базальная и индуцированная r-IL-5 секреция VEGF эозинофилами крови *in vitro* возрастала сравнительно с нормой только у больных раком желудка, сопровождающимся эозинофильной инфильтрацией опухолевой ткани. При этом у больных этой группы

добавление r-IL-5 в культуру эозинофилов не сопровождалось увеличением *in vitro* секреции VEGF по сравнению с базальным ее уровнем ($p > 0,05$), что может свидетельствовать об истощении функционального резерва и (как следствие) низкой реактивности клеток (табл. 1). У пациентов с раком желудка без эозинофилии, а также у больных раком толстого кишечника с эозинофилией и без нее значения базальной и r-IL-5-индуцированной секреции VEGF эозинофильными гранулоцитами *in vitro* соответствовали контрольным значениям (см. табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Table 1

Секреция ростовых факторов в <i>in vitro</i> культуре эозинофильных гранулоцитов у больных раком желудка и толстого кишечника, пг/мл, $Me (Q_1-Q_3)$					
Secretion of growth factors <i>in vitro</i> in eosinophil culture in gastric and colon cancer patients, pg/ml, $Me (Q_1-Q_3)$					
Группы обследованных лиц Groups the examined persons		VEGF		EGF	
		Базальная секреция Basal secretion	Секреция, индуцированная r-IL-5 Secretion, induced by r-IL-5	Базальная секреция Basal secretion	Секреция, индуцированная r-IL-5 Secretion, induced by r-IL-5
Здоровые доноры Healthy donors		1,83 (0,40–2,35)	3,76 (1,81–5,10)	0,52 (0,20–0,93)	0,19 (0,08–0,21)
Больные раком желудка Patients with gastric cancer	с эозинофильной инфильтрацией ткани опухоли, $n = 19$ with eosinophilic infiltration of tumor tissue, $n = 19$	26,23 (15,52–33,03) $p_1 < 0,05$	15,88 (11,42–21,23) $p_1 < 0,05$	0,65 (0,54–1,23)	1,13 (0,80–2,72) $p_1 < 0,05$
	без эозинофильной инфильтрации ткани опухоли, $n = 21$ without eosinophilic infiltration of tumor tissue, $n = 21$	3,66 (2,18–5,09) $p_2 < 0,05$	1,80 (1,16–2,98) $p_2 < 0,05$	0,79 (0,37–1,95)	0,31 (0,15–2,94)
Больные раком толстого кишечника Patients with colon cancer	с эозинофильной инфильтрацией ткани опухоли, $n = 23$ with eosinophilic infiltration of tumor tissue, $n = 23$	3,43 (1,35–5,74)	4,01 (1,35–6,46)	0,78 (0,43–1,09)	0,88 (0,65–1,33) $p_1 < 0,05$
	без эозинофильной инфильтрации ткани опухоли, $n = 20$ without eosinophilic infiltration of tumor tissue, $n = 20$	3,83 (2,62–5,04)	2,12 (1,22–3,70)	0,68 (0,58–1,21)	0,86 (0,45–1,35)

Примечание. Уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров – p_1 ; у больных с тканевой эозинофилией – p_2 ; r-IL-5 – рекомбинантный IL-5.

Note. The level of statistically significant differences in compare to similar parameters in healthy donors – p_1 ; in patients with tissue eosinophilia – p_2 ; r-IL-5 – recombinant IL-5.

Эозинофильные гранулоциты за счет секреции VEGF могут оказывать модулирующее влияние на пролиферацию клеток, экспрессирующих на своей поверхности комплементарные рецепторы [7]. Рецепторы к VEGF присутствуют в основном на мембране эндотелиоцитов, вместе с тем их экспрессия зарегистрирована на клетках злокачественных опухолей щитовидной железы, шейки матки, предстательной железы и др. [21, 22]. Это обосновывает дуализм свойств ангиогенных факторов, связанный как с опосредованным, так и с

прямым влиянием VEGF на процессы пролиферации клеток опухолей.

По результатам иммуногистохимического исследования во всех образцах тканей неопластических образований желудка и толстого кишечника были идентифицированы опухолевые клетки, несущие VEGFR. При этом относительное содержание VEGFR-позитивных клеток в опухоли у больных раком желудка и раком толстого кишечника без эозинофильной инфильтрации и при ее наличии было сопоставимым (табл. 2).

Т а б л и ц а 2
Table 2

Экспрессия рецепторов ростовых факторов VEGFR и EGFR в опухолевой ткани при раке желудка и толстого кишечника, %, $M \pm \sigma$				
Expression of growth factor receptors VEGFR and EGFR in tumor tissue in gastric and colon cancer, %, $M \pm \sigma$				
Показатель Characteristic	Локализация опухоли Tumor localization			
	Рак желудка, $n = 52$ Gastric cancer, $n = 52$		Рак толстого кишечника, $n = 55$ Colon cancer, $n = 55$	
	с эозинофильной инфильтрацией ткани опухоли, $n = 25$ with eosinophilic infiltration of tumor tissue, $n = 25$	без эозинофильной инфильтрации ткани опухоли, $n = 27$ without eosinophilic infiltration of tumor tissue, $n = 27$	с эозинофильной инфильтрацией ткани опухоли, $n = 23$ with eosinophilic infiltration of tumor tissue, $n = 23$	без эозинофильной инфильтрации ткани опухоли, $n = 32$ without eosinophilic infiltration of tumor tissue, $n = 32$
VEGFR	$13,20 \pm 8,47$	$12,81 \pm 10,43$	$15,22 \pm 9,34$	$14,87 \pm 12,37$
	$F = 0,02; p > 0,05$		$F = 0,01; p > 0,05$	
EGFR	$9,16 \pm 4,62$	$23,15 \pm 12,72$	$12,65 \pm 9,92$	$20,19 \pm 11,42$
	$F = 26,69; p < 0,05$		$F = 6,49; p < 0,05$	

Примечание. Уровень статистической значимости различий между показателями у пациентов с тканевой эозинофилией и без тканевой эозинофилии – p ; F – значение F -статистики по результатам дисперсионного анализа.

Note. The level of statistically significant differences between indicators in patients with and without tissue eosinophilia – p ; F – value of F -statistic based on the results of variance analysis.

Взаимосвязь между экспрессией VEGFR и присутствием в составе опухолевого микроокружения эозинофилов, способных продуцировать VEGF, у пациентов с раком желудка, сопровождающимся тканевой эозинофилией, не выявлена. Полученные нами результаты свидетельствуют о преимущественной экспрессии рецептора VEGFR на мембране эндотелиоцитов. При действии VEGF повышается проницаемость сосудистой стенки с последующей ее дезорганизацией, что способствует интравазации клеток опухоли и формированию очагов метастазирования [23]. Кроме этого VEGF может стимулировать ангиогенез опухоли путем привлечения из костного мозга кроветворных и эндотелиальных клеток-предшественниц [24].

Другим фактором активации пролиферации эндотелиальных и опухолевых клеток является эпидермальный фактор роста EGF [25, 26]. В ор-

ганизме человека EGF обнаруживается в тромбоцитах, лейкоцитах и жидкостных средах – моче, слюне, плазме крови и др. [14, 21]. Взаимодействие ростового фактора с комплементарным рецептором EGFR активирует процессы репликации ДНК, синтеза белков с онкогенными свойствами и неконтролируемое деление клеток [10]. Избыточная секреция EGF клетками может быть следствием мутационных изменений и усиленной экспрессии кодирующего гена, что лежит в основе развития и прогрессия многих опухолей эпителиального происхождения [25].

При изучении секреции эпидермального фактора роста EGF эозинофильными гранулоцитами крови у больных раком желудка и толстого кишечника установлено, что у всех пациентов независимо от наличия тканевой эозинофилии базальная секреция EGF эозинофилами крови *in vitro* соответствовала контрольным значени-

ям (см. табл. 1). В то же время при индукции клеток γ -IL-5 (ключевым активатором эозинофилов) у больных раком желудка и раком толстого кишечника, сопровождающимся тканевой эозинофилией, концентрация этого медиатора в *in vitro* культуре эозинофильных гранулоцитов оказалась достоверно выше, чем в контроле (см. табл. 1). Полученные результаты указывают на то, что в условиях дополнительной стимуляции эозинофильные гранулоциты способны мобилизовать свой функциональный резерв и нарабатывать EGF.

У больных раком желудка и толстого кишечника оценивалась также экспрессия рецептора эпидермального ростового фактора EGFR в опухолевой ткани. Показано, что при раке желудка и раке толстого кишечника с тканевой эозинофилией процентное содержание опухолевых клеток, несущих EGFR, было в 2,5 и 1,5 раза ниже величины соответствующего показателя у больных раком указанных локализаций без эозинофилии (см. табл. 2). Гипоэкспрессия опухолевыми клетками EGFR значительно снижает вероятность их пролиферации ввиду дисбаланса механизмов рецепции и трансдукции сигнала с поверхности внутрь клетки [27]. По данным литературы, низкая экспрессия EGFR в опухолевой ткани является показателем благоприятного прогноза и ассоциируется с отсутствием очагов регионарного метастазирования при раке молочной железы, раке яичников и раке желудка [28, 29]. При раке толстого кишечника уровень экспрессии EGFR рассматривается в качестве прогностического маркера возникновения рецидива и выживаемости пациентов после проведения хирургического лечения [30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У больных со злокачественными новообразованиями органов желудочно-кишечного тракта с эозинофильной инфильтрацией ткани опухоли отмечается избыточная *in vitro* секреция эозинофильными гранулоцитами крови VEGF (при раке желудка) и EGF (при раке желудка и раке толстого кишечника в условиях индукции клеток γ -IL-5). Однако недостаточная экспрессия в опухолевой ткани желудка и толстого кишечника рецепторов ростовых факторов VEGFR и EGFR, по-видимому, препятствует полноценной реализации регуляторных эффектов их лигандов и не позволяет эозинофилам использовать секреторируемые факторы в механизмах контроля роста и пролиферации опухолевых клеток.

Не исключено опосредованное влияние эозинофильных гранулоцитов на неоангиогенез опухоли, обеспечивающего выживание трансформированных клеток и их метастатическое распространение.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Quail D.F., Joyce J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 2013; 19 (11): 1423–1437. DOI: 10.1038/nm.3394.
2. Wei Y., Zhang X., Wang G., Zhou Y., Luo M., Wang S., Hong C. The impacts of pretreatment circulating eosinophils and basophils on prognosis of stage I-III colorectal cancer. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. 2018; Oct. 14 (5): 243–251. DOI: 10.1111/ajco.12871.
3. Legrand F., Driss V., Delbeke M., Loiseau S., Hermann E., Dombrowicz D., Capron M. Human eosinophils exert TNF- α and granzyme A-mediated tumoricidal activity toward colon carcinoma cells. *The Journal of Immunology*. 2010; 185 (12): 7443–7451. DOI: 10.4049/jimmunol.1000446.
4. Reichman H., Karo-Atar D., Munitz A. Emerging roles for eosinophils in the tumor microenvironment. *Trends in Cancer*. 2016; 2 (11): 664–675. DOI: 10.1016/j.tre-can.10.002.
5. Колобовникова Ю.В., Янкович К.И., Романова Е.В., Дмитриева А.И., Новицкий В.В., Уразова О.И. Особенности экспрессии CCL11/эотаксина, рецептора CCR3 и эозинофильной пероксидазы в опухолевой ткани при раке желудка и толстого кишечника. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (3): 80–87. [Kolobovnikova Yu.V., Yankovich K.I., Romanova E.V., Dmitrieva A.I., Noviczkiy V.V., Urazova O.I. The expression of CCL11/eotaxin, CCR3 receptor and eosinophil peroxidase in tumor tissue in gastric and colon cancers. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (3): 80–87 (in Russ.). DOI: 10.20538/1682-0363-2018-3-80-87.
6. Legrand F., Driss V., Woerly G., Loiseau S., Hermann E., Fournie J.J., Heliot L., Mattot V., Soncin F., Gougeon M.L., Dombrowicz D., Capron M. A functional $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex distinct from $\gamma\delta$ T cells is expressed by human eosinophils. *PLoS One*. 2009; 4 (6). DOI: 10.1371/journal.pone.0005926. URL: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0005926&type=printable>.
7. Puxeddu I., Alian A., Piliponsky A.M., Ribatti D., Panet A., Levi-Schaffer F. Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005; 37 (3): 628–636. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.09.001.
8. Miller S.S., Apostolopoulos V., Nurgali K. Eosinophils in cancer: favourable or unfavourable? *Curr. Med. Chem.* 2016; 23 (7): 650–666.
9. Folkman J. Angiogenesis. *Annu. Rev. Med.* 2006; 57: 1–18.
10. Tiash S., Chowdhury E.H. Growth factor receptors: promising drug targets in cancer. *J. Cancer Metastasis Treat.* 2015; 1: 190–200. DOI: 10.4103/2394-4722.163151.

11. Rapisarda A., Melillo G. Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy. *Adv. Cancer Res.* 2012; 114: 237–267. DOI: 10.1016/B978-0-12-386503-8.00006-5.
12. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека; под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. 3-е изд., доп. и перераб. Казань: Титул, 2004: 456. [Manual of immunohistochemical methods in diagnosis of human tumors; ed. S.V. Petrov, N.T. Rayhlin. 3th issue, Kazan: Titul Publ., 2004: 456 (in Russ.)].
13. Туманский В.А., Евсеев А.В. Сравнительная оценка экспрессии ростовых рецепторов семейства ErbB, Ki-67 и E-кадгерина клетками протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. *Патология.* 2014; 3 (32): 55–59. [Tumanskiy V.A., Evseev A.V. Comparative evaluation of growth factors ErbB, Ki-67 and E-cadherin expression in cells of pancreatic adenocarcinoma. *Pathology.* 2014; 3 (32): (in Russ.)].
14. Niyaz M., Anwer J., Liu H. Zhang L., Shayhedin I., Awut I. Characterization of the expression and clinical features of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in esophageal carcinoma. *Oncol. Lett.* 2015; 10 (6): 3696–3704. DOI: 10.3892/ol.2015.3747.
15. Ciardiello F., Troiani T., Bianco R., Orditura M., Morgillo F., Martinelli E., Morelli M.P., Cascone T., Tortora G. Interaction between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways: a rational approach for multi-target anticancer therapy. *Ann. Oncol.* 2006; 17 (7): 109–114. DOI: 10.1093/annonc/mdl962.
16. Niu G., Chen X. Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy. *Current Drug Targets.* 2010; 11 (8): 1000–1017.
17. Rosenberg H.F., Dyer K.D., Foster P.S. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13 (1): 9–22. DOI: 10.1038/nri3341.
18. Shamri, R., Xenakis J.J., Spencer L.A. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *J. Cell and Tissue Research.* 2010; 343 (1): 57–83. DOI: 10.1007/s00441-010-1049-6.
19. Lee S.H., Jeong D., Han Y.S., Baek M.J. Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Annals of Surgical Treatment and Research.* 2015; 89 (1): 1–8. DOI: 10.4174/ast.2015.89.1.1.
20. Wang K., Peng H.L., Li L.K. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with prostate cancer: a systematic review with meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2012; 13 (11): 5665–5669. DOI: 10.7314/APJCP.2012.13.11.5665.
21. Rodriguez-Antona C., Pallares J., Montero-Conde C., Inglada-Perez L., Castelblanco E., Landa I., Leskela S., Leandro-Garcia L.J., Lopez-Jimenez E., Leton R., Cascon A., Lerma E., Martin M.C., Carralero M.C., Mauricio D., Cigudosa J.C., Matias-Guiu X., Robledo M. Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis. *Endocr. Relat. Cancer.* 2010; 17 (1): 7–16. DOI: 10.1677/ERC-08-0304.
22. Pallares J., Rojo F., Iriarte J., Morote J., Armadans L.I., de Torres I. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *Histol. Histopathol.* 2006; 21 (8): 857–865. DOI: 10.14670/HH-21.857.
23. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011; 473 (7347): 298–307. DOI: 10.1038/nature10144.
24. Rafii S., Lyden D., Benezra R., Hattori K., Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2 (11): 826–835. DOI: 10.1038/nrc925.
25. Пивень Н.В., Бураковский А.И., Прохорова В.И., Красный С.А., Шишло Л.М. Эпидермальный фактор роста и его рецепторы как перспективные клинико-диагностические и прогностические маркеры онкопатологии. *Онкологический журнал.* 2014; 1 (29): 82–92. [Piven' N.V., Burakovskiy A.I., Prohorova V.I., Krasniy S.A., Shishlo L.M. Epidermal growth factor and its receptors as perspective clinical-diagnostic and prognostic markers of oncopathology. *Journal of Oncology.* 2014; 1 (29): 82–92 (in Russ.)].
26. Normanno N., De Luca A., Bianco C., Strizzi L., Mancino M., Maiello M.R., Carotenuto A., De Feo G., Caponigro F., Salomon D.S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 2006; 366 (1): 2–16. DOI: 10.1016/j.gene.2005.10.018.
27. Mendelsohn J., Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21 (14): 2787–2799. DOI: 10.1200/JCO.2003.01.504.
28. Lieto E., Ferraraccio F., Orditura M., Castellano P., Mura A.L., Pinto M., Zamboli A., De Vita F., Galizia G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients. *Ann. Surg. Oncol.* 2008; 15 (1): 69–79. DOI: 10.1245/s10434-007-9596-0.
29. Niyaz M., Anwer J., Liu H., Zhang L., Shayhedin I., Awut I. Characterization of the expression and clinical features of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in esophageal carcinoma. *Oncol. Lett.* 2015; 10 (6): 3696–3704. DOI: 10.3892/ol.2015.3747.
30. Galizia G., Lieto E., Ferraraccio F., De Vita F., Castellano P., Orditura M., Imperatore V., La Mura A., La Manna G., Pinto M., Catalano G., Pignatelli C., Ciardiello F. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery. *Ann. Surg. Oncol.* 2006; 13 (6): 823–835. DOI: 10.1245/ASO.2006.05.052.

Вклад авторов

Янкович К.И., Романова Е.В., Полетика В.С. – проведение исследований, анализ и интерпретация данных. Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И. – разработка концепции и дизайна исследования, обоснование цели, основных положений и заключения рукописи. Уразова О.И., Новицкий В.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение рукописи для публикации.

Сведения об авторах

Колобовникова Юлия Владимировна, д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-7156-2471.

Янкович Кристина Игоревна, мл. науч. сотрудник, ЦНИЛ, СибГМУ; врач клинико-диагностической лаборатории, ТООД, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-8893-0939.

Романова Елена Викторовна, ст. преподаватель, кафедра микробиологии и вирусологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-8769-5743.

Дмитриева Алла Ивановна, д-р мед. наук, зав. клинико-диагностической лабораторией, ТООД, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-5247-9872.

Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, ТУСУР, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9457-8879.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки Российской Федерации, кафедра патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, ТУСУР, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9577-8370.

Полетика Вадим Сергеевич, аспирант, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-2005-305X.

(✉) Колобовникова Юлия Владимировна, e-mail: kolobovnikova.julia@mail.ru.

Поступила в редакцию 18.10.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Authors contribution

Yankovich K.I., Romanova E.V., Poletika V.S. – carrying out of the research, analysis and interpretation of the data. Kolobovnikova Yu.V., Dmitrieva A.I. – conception and design, justification of the objective, highlights and conclusion of the manuscript. Urazova O.I., Novitskii V.V. – critical revision of the manuscript for important intellectual content and final approval of the manuscript for publication.

Authors information

Kolobovnikova Yuliya V., DM, Professor, Pathophysiology Division, SSMU; Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-7156-2471.

Yankovich Kristina I., Junior Researcher, Central Research Laboratory, SSMU; Doctor, Clinical Diagnostic Laboratory, TROD, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-8893-0939.

Romanova Elena V., Senior Lecturer, Microbiology and Virology Division, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8769-5743.

Dmitrieva Alla I., DM, Head of Clinical Diagnostic Laboratory, TROD, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-5247-9872.

Urazova Olga I., DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Pathophysiology Division, SSMU; Professor of the Department of Complex Information Security of Computer Systems, TUSUR, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9457-8879.

Novitskiy Vyacheslav V., DM, Professor, Academician of RAS, Honored Scientist of Russia, Professor, Pathophysiology Division, SSMU; Professor, Department of Complex Information Security of Computer Systems, TUSUR, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9577-8370.

Poletika Vadim S., PhD Student, Pathophysiology Division, SSMU; Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-2005-305X.

(✉) Kolobovnikova Yuliya V., e-mail: kolobovnikova.julia@mail.ru.

Received 18.10.2018
Accepted 17.12.2018

Уровень мРНК CD16A и CD16B как потенциальный иммунологический маркер при колоректальном раке

Красногорова Н.В.¹, Новиков Д.В.¹, Фомина С.Г.¹, Алясова А.В.²,
Магомедов М.А.³, Новиков В.В.¹, Караулов А.В.⁴

¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет (ННГУ) имени Н.И. Лобачевского
Россия, 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

² Приволжский исследовательский медицинский университет (ПИМУ)
Россия, 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

³ Нижегородский областной клинический онкологический диспансер (НОКОД)
Россия, 603081, г. Нижний Новгород, шоссе Анкудиновское, 1

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет (МГМУ) им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет)
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – оценить уровни мРНК генов, кодирующих CD16A (*FCGR3A*) и CD16B (*FCGR3B*), в периферической крови и опухолях больных колоректальным раком (КРР).

Материалы и методы. В исследование включили 66 больных КРР, проходивших лечение в Нижегородском областном клиническом онкологическом диспансере. Группа сравнения состояла из 111 доноров крови из Нижегородского областного центра крови имени Н.Я. Климовой. Определение относительных уровней мРНК в образцах периферической крови и опухолях проводили методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. В периферической крови больных КРР уровень мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* был статистически значимо ниже, чем у здоровых лиц. Сниженный уровень сохранялся через 7–10 дней после операции. Нормированный уровень мРНК *FCGR3A* в крови и опухолях больных КРР, а также в крови здоровых доноров в несколько раз превышал уровень мРНК *FCGR3B*. На II стадии развития опухоли у больных КРР уровень мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* статистически значимо снижался, но по мере прогрессии опухоли нормализовался. Умеренная степень дифференцировки опухоли также характеризовалась падением уровня мРНК тестируемых генов, при высокой степени дифференцировки наблюдалась направленность к падению. Сниженный уровень мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* в крови больных обнаруживался при отсутствии метастазов. В образцах опухолей мРНК *FCGR3A* тестировалась в 95,5% случаев, мРНК *FCGR3B* – 68,2%. Прогрессирование КРР сопровождалось повышением уровня мРНК *FCGR3A* в опухолях, уровень мРНК *FCGR3B* не менялся. Обнаружена положительная корреляционная связь уровня мРНК *FCGR3A* с уровнем мРНК *TNF* и *FOXP3*, что свидетельствует о возможной вовлеченности *FCGR3A* в регуляцию хронического воспаления в опухолях больных КРР.

Заключение. В крови и образцах опухолей обнаружены изменения уровня мРНК генов, кодирующих молекулы CD16A (*FCGR3A*) и CD16B (*FCGR3B*). Результаты свидетельствуют о потенциальной возможности использования данных показателей в качестве мониторинговых иммунологических маркеров при КРР.

Ключевые слова: CD16A, *FCGR3A*, CD16B, *FCGR3B*, мРНК, колоректальный рак.

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

Источник финансирования. Поддерживается Проектом повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено комиссией по биотике ННГУ имени Н.И. Лобачевского (протокол № 7 от 28.09.2018 г.).

Для цитирования: Красногорова Н.В., Новиков Д.В., Фомина С.Г., Алясова А.В., Магомедов М.А., Новиков В.В., Караулов А.В. Уровень мРНК CD16A и CD16B как потенциальный иммунологический маркер при колоректальном раке. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 220–227. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-220-227>.

УДК 616.348/.35-006.6-097

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-220-227>

The CD16A and CD16B mRNA level as potential immunological marker in colorectal cancer

Krasnogorova N.V.¹, Novikov D.V.¹, Fomina S.G.¹, Alyasova A.V.²,
Magomedov MA.³, Novikov V.V.¹, Karaulov A.V.⁴

¹ National Research Nizhny Novgorod State University N.I. Lobachevsky (UNN)
23, Gagarin Av., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

² Privolzhsky Research Medical University (PRMU)
10/1, Minin and Pozharsky Sq., Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation

³ Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncology Center
1 Ankudinovskoe Sh., Nizhny Novgorod, 603081, Russian Federation

⁴ Sechenov First Moscow Medical University
8/2, Trubetskoy Str., Moscow, 119991, Russian Federation

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate mRNA levels of genes encoding CD16A (*FCGR3A*) and CD16B (*FCGR3B*) in peripheral blood and tumors of colorectal cancer patients (CRC).

Materials and methods. The study included 66 CRC patients from Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncology Center and 111 people without cancer as a comparison group from Nizhny Novgorod Regional Blood Center named after N.Ya. Klimova. The mRNA relative levels in peripheral blood and tumor was detected by reverse transcription real-time polymerase chain reaction. The mRNA levels correlation and association with CRC clinical characteristics were assessed by statistic methods.

Results. The study suggests that in the peripheral blood of CRC patients the levels of mRNA *FCGR3A* and *FCGR3B* were statistically significantly lower than in healthy individuals. The mRNA levels remained low at 7–10 days after surgery. The *FCGR3A* mRNA normalized level in the blood and tumors of CRC patients, as well as in the blood of healthy individuals, was several times higher than the *FCGR3B* mRNA level. At the II stage of tumor development in CRC patients, the *FCGR3A* and *FCGR3B* mRNA levels were statistically significantly decreased, but as the tumor progressed is normalized. Moderate degree of tumor differentiation was also characterized by a drop in mRNA levels of the tested genes. Reduced *FCGR3A* and *FCGR3B* mRNA levels in the blood of patients were observed in the absence of metastases. In tumor samples, *FCGR3A* mRNA was tested in 95.5% of cases, *FCGR3B* mRNA in 68.2% of cases. Progression of CRC was accompanied by an increase in *FCGR3A* mRNA level in tumors, the *FCGR3B* mRNA level did not change. Positive correlation of *FCGR3A* mRNA level with *TNF* and *FOXP3* mRNA levels was found, which indicates the possible involvement of *FCGR3A* in the regulation of chronic inflammation in tumors of CRC patients.

Conclusion. Changes in mRNA levels of genes encoding CD16A (*FCGR3A*) and CD16B (*FCGR3B*) molecules were detected in blood and tumor samples. The results indicate the potential for their use as monitoring immunological markers in CRC.

Key words: CD16A, *FCGR3A*, CD16B, *FCGR3B*, mRNA, colorectal cancer.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. Supported by the Project to increase the competitiveness of leading Russian universities among the world's leading research and educational centers.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the bioethics commission under UNN (Protocol No. 7 of 28.09.2018).

For citation: Krasnogorova N.V., Novikov D.V., Fomina S.G., Alyasova A.V., Magomedov M.A., Novikov V.V., Karaulov A.V. The CD16A and CD16B mRNA level as potential immunological marker in colorectal cancer. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 220–227. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-220-227>.

ВВЕДЕНИЕ

Низкоаффинные рецепторы Fc-фрагментов иммуноглобулинов G III типа (CD16, *FCGR3*) кодируются у человека двумя генами: *FCGR3A* и *FCGR3B*. Экспрессия белка CD16A (*FCGR3A*) характерна для натуральных киллеров. Дополнительно CD16A обнаруживается на мембране моноцитов, тканеспецифичных макрофагов, $\gamma\delta$ T-лимфоцитов и дендритных клеток. Белок CD16B (*FCGR3B*) является молекулярным маркером нейтрофилов. Также CD16B на низком уровне экспрессируется на базофилах и выявляется на эозинофилах после индукции интерфероном γ [1]. Оценка экспрессии мембранных молекул CD16 используется для определения популяционного состава клеток периферической крови и их функционального состояния при различных, в том числе онкологических заболеваниях. Так, при колоректальном раке (КРР) показано, что фенотипическая оценка содержания CD16⁺-клеток может быть использована для прогноза выживаемости больных и предсказания ответа на химиотерапию [2]. Однако на транскрипционном уровне детального изучения экспрессии *FCGR3A* и *FCGR3B* генов в периферической крови и опухолях больных КРР не проводилось.

Целью исследования явилась оценка уровня мРНК генов, кодирующих CD16A (*FCGR3A*) и CD16B (*FCGR3B*), в периферической крови и опухолях больных КРР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследован биологический материал от 66 больных КРР, проходивших лечение в ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический

онкологический диспансер». Для сравнения использовали периферическую кровь от 111 здоровых доноров, полученную из «Нижегородского областного центра крови имени Н.Я. Климовой». От каждого участника было получено информированное согласие на включение в исследование.

Все исследуемые образцы смешивали с равным объемом консервирующего раствора (4 М гуанидин тиоционат, 100 мМ цитрат натрия и 0,1%-й Triton X-100) и хранили при -20°C до использования. Выделение нуклеиновых кислот проводили методом, предложенным в работе Р. Chomczynski и N. Sacchi [3]. Комплементарную ДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы М-MLV (ЗАО «Силекс», Россия) согласно рекомендации производителя. Определение относительного уровня мРНК *FCGR3* и фактора некроза опухоли (TNF) проводили с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием амплификаторов DTlite 4 (ООО «ДНК-Технология», Россия) и CFX96 TouchTM (BioRad, США) в следующих температурных режимах: 94°C – 10 мин, 50 циклов ПЦР 94°C – 20 с, 60°C – 20 с, 72°C – 20 с. Для мРНК FOXP3 использовали следующие условия: 94°C – 10 мин, 50 циклов ПЦР 94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с. Реакционная смесь содержала 70 мМ трис-HCl, pH 8,3, 16 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgCl_2 , 2,5 единицы активности HotTaq-полимеразы (ЗАО «Силекс», Россия), 0,8 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатов и по 0,4 мМ каждого из олигонуклеотидов (ЗАО «Синтол», Россия), последовательность которых представлена в табл. 1.

Т а б л и ц а 1
Table 1

Структура олигонуклеотидов Oligonucleotides structure		
Ген Gene	Олигонуклеотид Oligonucleotide	Первичная структура (5'–3') Primary structure (5'–3')
<i>FCGR3A</i> или/or B	FAB	GCTCTGCTACTTCTAGTTTCA
<i>FCGR3A</i>	RA	CACTGTCCTTCTCGAGCACC
<i>FCGR3B</i>	RB	CACTGTCCTTCTCAAGCACG
<i>FCGR3A</i> или/or B	FAB Z	ROX-CTGTGGTGTTCCTGGAGCCTCAATGGTA-BHQ-2
<i>UBC</i>	UBC F	GCACAGCTAGTTCCGTCGCA
	UBC R	GAAGATCTGCATTGTCAAGT
	UBC Z	Cy5-ATTTGGGTCGCAGTTCTTGTGTGGAT-RTQ-2
<i>YWHAZ</i>	YW F	TGCAATGATGTACTGTCTCT
	YW R	ACTGATCGACAATCCCTTTC
	YW Z	Cy5-ATTACTACCGTTACTTGGCTGAGGTTGCC-BHQ-2
<i>TNF</i>	TNF F	CTCTTCTCCTTCCTGATCGTG
	TNF R	TTGAGGGTTTGCTACAACATGG
	TNF Z	ROX-AGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTAATC-BHQ-2
<i>FOXP3</i>	FOXP3 F	GAGAAGCTGAGTGCCATGCA
	FOXP3 R	GGAGCCCTTGTTCGGATGAT
	FOXP3 Z	FAM- TGCCATTTTCCCAGCCAGGTGG-BHQ-1

Уровни мРНК рассчитывали по формуле $\Delta\Delta Ct$ с учетом эффективности реакции [4]. Нормировку уровней мРНК в периферической крови проводили относительно уровня мРНК убиквитина С (*UBC*), в ткани опухолей – относительно среднего геометрического уровней мРНК (*UBC*) и тирозин 3-монооксигеназы/триптофан 5-монооксигеназы активационного протеина зета (*YWHAZ*).

Статистическую обработку данных выполняли методами статистики с помощью компьютерных программ Statistica, версия 8.0 (StatSoft Inc., США) и GraphPad Prism, версия 5.0 (GraphPad Software, США). Исследованные количественные показатели представлены в виде $Me (Q_1-Q_3)$, где Me – медиана, Q_1 – нижний квартиль (25%), (Q_3) – верхний квартиль (75%). Для сравнения двух независимых групп по количественным признакам применяли двусторонний критерий Манна – Уитни (U), при сравнении трех и более независимых групп использовали критерий Краскела – Уоллиса (H). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для установления связей между уровнями мРНК рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена r .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение относительного уровня мРНК генов *FCGR3A* и *FCGR3B* в периферической крови доноров и больных КРР показало, что она детектировалась во всех исследованных образ-

цах. Уровень мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* в крови первичных больных КРР был статистически значимо ниже, чем у доноров в среднем в 1,5 раза ($p < 0,05$). Сниженные уровни сохранялись через 7–10 дней после резекции опухоли. Нормированный уровень мРНК *FCGR3A* у больных КРР и доноров был в среднем в три раза выше уровня мРНК *FCGR3B* (рис.).

У мужчин, больных КРР, обнаруживалось статистически значимое снижение уровня мРНК *FCGR3B* в 1,8 раза ($p = 0,022$) по сравнению со здоровыми мужчинами и отмечалась направленность к снижению уровня мРНК *FCGR3A*. У женщин, больных КРР, наблюдали лишь тенденцию к снижению уровня мРНК обоих исследуемых генов.

При сопоставлении уровня мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* в периферической крови у больных КРР в зависимости от особенностей течения заболевания выявлялся сходный характер их изменений. Так, у больных с высокодифференцированными и умеренно дифференцированными опухолями обнаруживался пониженный уровень мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B*. У больных с низкодифференцированными опухолями уровень экспрессии тестируемых генов в периферической крови был выше и достигал нормальных значений. Обнаружено, что на III, IV стадиях заболевания уровень мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* в крови больных КРР находился в пределах нормы, на II стадии был статистически значимо ниже, чем у доноров.

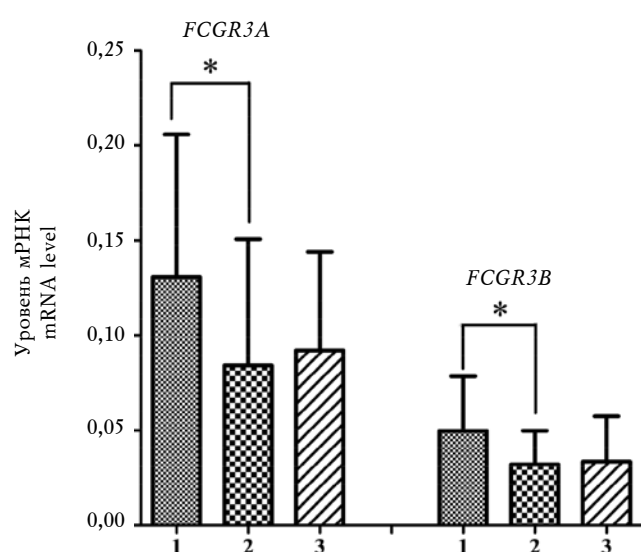


Рисунок. Уровень мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* в периферической крови: 1 – доноров ($n = 111$), 2 – больных КРР при поступлении в стационар и 3 – после оперативного вмешательства ($n = 42$). * $p < 0,05$

Figure. The *FCGR3A* and *FCGR3B* mRNA level in peripheral blood: 1 – donors, ($n = 111$), 2 – patients with CRC at admission in hospital ($n = 54$), 3 – after surgery ($n = 42$). * $p < 0.05$

При этом необходимо отметить, что на I стадии также выявлялся нормальный уровень мРНК тестируемых генов. В случае прорастания опухоли в мышечную оболочку (T2) уровни мРНК обоих генов в крови больных соответствовали нормальным значениям. Дальнейшее прорастание опухоли (T3) сопровождалось статистически значимым падением уровня мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* ($p < 0,05$), а на стадии T4 в крови боль-

ных опять регистрировались их уровни, соответствующие таковым у здоровых доноров.

При отсутствии регионарных метастатических узлов уровень мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* был статистически значимо ниже нормы в 2,0 и 2,6 раза соответственно ($p < 0,05$). Появление регионарных метастатических узлов (N1 и N2) приводило к увеличению уровней мРНК тестируемых генов до нормальных значений. Наличие отдаленных метастазов также сопровождалось нормальным уровнем мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B*. На 7–10-й день после удаления опухоли статистически значимых различий в уровне мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* у одних и тех же больных при поступлении в стационар и после оперативного вмешательства не обнаруживалось.

При исследовании уровня мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* в опухолях больных КРР частота обнаружения составила 95,5% (63/66) и 68,2% (45/66) соответственно. При этом медиана уровня мРНК *FCGR3A* превышала медиану уровня мРНК *FCGR3B* в 12,2 раза. Уровень мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* в опухолях больных разного возраста, пола и с разной степенью дифференцировки опухоли статистически значимо не отличались. На I стадии отмечался наименьший уровень мРНК *FCGR3A*, который обнаруживал направленность к повышению, и на IV стадии превышал исходную величину в 3,5 раза ($p = 0,04$). Наиболее высокий уровень мРНК *FCGR3A* выявлялся у больных с множественными метастазами в лимфатические узлы. В отличие от мРНК *FCGR3A* уровень мРНК *FCGR3B* в опухолях не обнаруживал статистически значимых изменений на разных стадиях КРР и в зависимости от наличия и отсутствия метастазов (табл. 2).

Таблица 2

Table 2

Уровень мРНК <i>FCGR3A</i> и <i>FCGR3B</i> в периферической крови и опухолях больных колоректальным раком, $Me (Q_1-Q_3)$ The <i>FCGR3A</i> and <i>FCGR3B</i> mRNA levels in peripheral blood and tumors of colorectal cancer patients, $Me (Q_1-Q_3)$							
Параметр Characteristic	Категория Category	Кол-во больных Number of patients		Уровень мРНК в крови Blood mRNA levels		Уровень мРНК в опухолях Tumor mRNA levels	
		кровь blood	опухоль tumor	<i>FCGR3A</i>	<i>FCGR3B</i>	<i>FCGR3A</i>	<i>FCGR3B</i>
Степень дифференцировки Differentiation degree	Высокая High	8	6	0,087* (0,035–0,121)	0,031 (0,014–0,058)	0,018 (0,012–0,151)	0,002 (0–0,374)
	Умеренная Moderate	27	35	0,080* ^ч (0,040–0,160)	0,026* ^ч (0,015–0,061)	0,063 (0,029–0,270)	0,015 (0–0,090)
	Низкая Low	5	5	0,169 (0,128–0,274)	0,056 (0,040–0,067)	0,057 (0,011–0,103)	0,001 (0–0,040)
Стадия заболевания Stage of the disease	I	6	6	0,105 (0,036–0,211)	0,037 (0,014–0,063)	0,018 (0,014–0,034)	0,002 (0–0,113)

Продолжение табл. 2
End of table 2

Параметр Characteristic	Категория Category	Кол-во больных Number of patients		Уровень мРНК в крови Blood mRNA levels		Уровень мРНК в опухолях Tumor mRNA levels	
		кровь blood	опухоль tumor	<i>FCGR3A</i>	<i>FCGR3B</i>	<i>FCGR3A</i>	<i>FCGR3B</i>
	II	18	18	0,044 [†] (0,032–0,109)	0,016 [†] (0,012–0,038)	0,098 (0,015–0,433)	0,022 (0–0,107)
	III	6	24	0,096 (0,048–0,175)	0,040 (0,017–0,053)	0,059 (0,023–0,171)	0,001 (0–0,026)
	IV	8	11	0,130 (0,088–0,271)	0,042 (0,030–0,113)	0,063 ^{**} (0,028–0,106)	0,012 (0–0,035)
Размер опухоли Tumor size	T2	7	4	0,169 (0,037–0,277)	0,056 (0,015–0,067)	0,038 (0,020–0,115)	0,012 (0,002–0,324)
	T3	21	20	0,076 [†] (0,033–0,095)	0,023 [†] (0,013–0,037)	0,178 (0,033–0,598)	0,008 (0–0,077)
	T4	13	4	0,151 (0,051–0,195)	0,034 (0,022–0,064)	0,171 (0,046–0,674)	0,018 (0–0,083)
Метастазы в лимфатических узлах Lymph nodes metastases	N0	31	11	0,052 [†] (0,037–0,169)	0,025 [†] (0,014–0,056)	0,235 (0,046–0,837)	0,053 (0–0,123)
	N1	8	13	0,096 (0,062–0,206)	0,040 (0,022–0,069)	0,039 (0,019–0,129)	0,012 (0–0,026)
	N2	2	4	0,118 (0,080–0,156)	0,032 (0,026–0,037)	0,593 ^{***} (0,284–1,359)	0 (0–0,165)
Отдаленные метастазы Distant metastases	M0	35	24	0,055 [†] (0,037–0,160)	0,024 [†] (0,014–0,044)	0,148 (0,0313–0,531)	0,018 (03–0,088)
	M1	6	4	0,153 ^{****} (0,0973–0,342)	0,051 ^{****} (0,0313–0,150)	0,090 (0,0183–1,235)	0,080 (0,0013–0,167)

* статистически значимые различия в сравнении с низкодифференцированными опухолями. ** статистически значимые различия в сравнении с I стадией. *** статистически значимые различия в сравнении с N1. **** статистически значимые различия в сравнении с M0. [†] статистически значимые различия в сравнении с донорами крови.

* statistically significant differences compared with low differentiated tumors. ** statistically significant differences compared with I stage. *** statistically significant differences compared with N1. **** statistically significant differences compared with M0. [†] statistically significant differences compared with blood donors.

Для оценки связи между провоспалительным окружением клеток опухоли и уровнем экспрессии мРНК *FCGR3* у 58 больных КРР определяли относительный уровень мРНК *TNF* и *FOXP3*. Уровень мРНК *FCGR3A* значимо позитивно коррелировал с уровнями мРНК *FOXP3* ($r = 0,31$; $p = 0,02$) и *TNF* ($r = 0,35$; $p = 0,09$). Связи уровня мРНК *FCGR3B* с уровнем мРНК *TNF* и *FOXP3* не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие КРР сопровождается множественными нарушениями в состоянии иммунной системы, в том числе в количестве клеток, экспрессирующих CD16A и CD16B. На фоне тенденции к повышению числа натуральных киллеров, являющихся основными носителями CD16A, в периферической крови регистрируется снижение их функциональной активности [5]. Кроме того, наблюдается повышение числа CD16B⁺ нейтрофилов в периферической крови [6]. В соответствии с полученными нами данными, в клетках крови больных КРР обнаруживается ярко выраженная направленность

к падению экспрессии обоих генов, кодирующих изоформы CD16. Наиболее глубокое подавление активности тестируемых генов регистрировалось на II стадии КРР. Поздние стадии сопровождались нормализацией уровней мРНК. При этом более выраженные нарушения были выявлены у больных мужского пола, что отражает гендерные различия в картине иммунологических сдвигов при КРР [7]. Полученные данные являются дополнением к картине иммунологических нарушений, связанных с развитием иммуносупрессии при КРР, и демонстрируют снижение клетками крови экспрессии генов, кодирующих CD16A и CD16B. Различия в уровне мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* на разных стадиях заболевания потенциально могут быть использованы в мониторинговых целях.

Как в периферической крови, так и в опухолях нормированный уровень экспрессии гена *FCGR3A* многократно превышал уровень экспрессии *FCGR3B*. Опухоли характеризовались более высоким соотношением уровня экспрессии *FCGR3A* и *FCGR3B*. Это может быть связано или с незначи-

тельной инфильтрацией опухолей нейтрофилами, или с эффектом гибели нейтрофилов в опухолевом микроокружении путем нетоза, который, как недавно продемонстрировано, реализуется с участием CD16B [8]. Прогрессирование КРР сопровождалось повышением в опухолях уровня мРНК *FCGR3A*, но не *FCGR3B*. Положительная корреляционная связь уровня мРНК *FCGR3A* с уровнем мРНК *TNF* и *FOXP3* отражает вероятную вовлеченность экспрессии *FCGR3A* в регуляцию хронического воспаления в опухолях больных КРР. Ранее нами также была обнаружена корреляция уровня мРНК *FCGR3A* с экспрессией в опухолях больных КРР генов *IL2Rα*, *MUC1*, *ICAM1*, а также провоспалительного цитокина *IL-32* [9].

Ранее показано, что увеличение процентного содержания активированных *FOXP3*-позитивных Т-регуляторных клеток, инфильтрующих опухоль, ассоциировано с присутствием регионарных и отдаленных метастазов у больных КРР [10], а уровень мРНК *FOXP3* увеличен в опухолях больших размеров [11]. В нашем исследовании уровень мРНК *FCGR3A* также был повышен в опухолях больных с множественными регионарными метастазами, что указывает на вероятную связь высокого уровня мРНК *FCGR3A* с прогрессированием опухолевого процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нормированный уровень мРНК *FCGR3A* в крови и опухолях больных КРР, а также в крови здоровых доноров в среднем в несколько раз превышал уровень мРНК *FCGR3B*. На II стадии КРР уровень мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* понижались, но по мере прогрессирования опухоли нормализовались. Сниженный уровень мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* в крови больных наблюдался при отсутствии метастазов. Прогрессирование КРР сопровождалось повышением в опухолях уровня мРНК *FCGR3A*, уровень мРНК *FCGR3B* не менялся. Обнаружена положительная корреляционная связь уровня мРНК *FCGR3A* с уровнем мРНК *TNF* и *FOXP3*, что свидетельствует о возможной вовлеченности *FCGR3A* в регуляцию хронического воспаления в опухолях больных КРР. Результаты свидетельствуют о потенциальной возможности использования при КРР уровня мРНК *FCGR3A* и *FCGR3B* в качестве иммунологического маркера в мониторинговых целях.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gillis C., Gouel-Cheron A., Jonsson F., Bruhns P. Contribution of human FcγRs to disease with evidence from human polymorphisms and transgenic animal studies. *Front. Immunol.* 2014; 5: 254. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00254.
2. Schauer D., Starlinger P., Alidzanovic L., Zajc P., Maier T., Feldman A., Padickakudy R., Buchberger E., Elleder V., Spittler A., Stift J., Pop L., Gruenberger B., Gruenberger T., Brostjan C. Chemotherapy of colorectal liver metastases induces a rapid rise in intermediate blood monocytes which predicts treatment response. *Oncoimmunology.* 2016; 5 (6): e1160185. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1160185.
3. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols.* 2006; 1 (2): 581–585. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.
4. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods.* 2001; 25 (4): 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
5. Rocca Y.S., Roberti M.P., Julia E.P., Pampena M.B., Bruno L., Rivero S., Huertas E., Sanchez Loria F., Pairola A., Caignard A., Mordoh J., Levy E.M. Phenotypic and functional dysregulated blood NK cells in colorectal cancer patients can be activated by cetuximab plus IL-2 or IL-15. *Front. Immunol.* 2016; 7: 413. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00413.
6. Shaul M.E., Fridlender Z.G. Cancer related circulating and tumor-associated neutrophils – subtypes, sources and function. *FEBS J.* 2018 (в печати). DOI: 10.1111/febs.14524.
7. Klein S.L., Flanagan K.L. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2016; 16 (10): 626–638. DOI: 10.1038/nri.2016.90.
8. Millrud C.R., Kagedal A., Kumlien Georen S., Winqvist O., Uddman R., Razavi R., Munck-Wikland E., Cardell L.O. NET-producing CD16^{high} CD62L^{dim} neutrophils migrate to tumor sites and predict improved survival in patients with HNSCC. *Int. J. Cancer.* 2017; 140 (11): 2557–2567. DOI: 10.1002/ijc.30671.
9. Новиков Д.В., Фомина С.Г., Гурина Н.Н., Перенков А.Д., Красногорова Н.В., Шумилова С.В., Луковникова Л.Б., Новиков В.В., Караулов А.В. Корреляция экспрессии *MUC1*, *ICAM1*, *IL32*, *FcγR3A* и *FoxP3* в опухолевых очагах больных раком молочной железы. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (1): 35–39. [Novikov D.V., Fomina S.G., Gurina N.N., Perenkov A.D., Krasnogorova N.V., Shumilova S.V., Lukovnikova L.B., Novikov V.V., Karaulov A.V. The correlation of expression of *MUC 1*, *ICAM 1*, *IL 32*, *FcγR3A* and *FoxP3* in tumor nidus of patients with breast cancer. 2017; 62 (1): 35–39 (in Russ.).]
10. Lin Y.C., Mahalingam J., Chiang J.M., Su P.J., Chu Y.Y., Lai H.Y., Fang J.H., Huang C.T., Chiu C.T., Lin C.Y. Activated but not resting regulatory T cells accumulated in tumor microenvironment and correlated with tumor progression in patients with colorectal cancer. *Int. J. Cancer.* 2013; 132 (6): 1341–1350. DOI: 10.1002/ijc.27784.
11. Ganapathi S.K., Beggs A.D., Hodgson S.V., Kumar D.

Expression and DNA methylation of TNF, IFNG and FOXP3 in colorectal cancer and their prognostic sig-

nificance. *Br. J. Cancer*. 2014; 111 (8): 1581–1589. DOI: 10.1038/bjc.2014.477.

Вклад авторов

Красногорова Н.В. – выполнение практической части исследования, разработка дизайна, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Новиков Д.В. – разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания. Фомина С.Г. – получение данных. Новиков В.В. – проверка интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Алясова А.В. – значительный вклад в концепцию статьи. Магомедов М.А. – значительный вклад в концепцию статьи. Караулов А.В. – проверка интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Красногорова Наталья Викторовна, аспирант, кафедре молекулярной биологии и иммунологии, мл. науч. сотрудник, научно-образовательный центр «Физика твердотельных наноструктур», ННГУ им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород. ORCID iD 0000-0002-8800-4553.

Новиков Дмитрий Викторович, канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник, научно-образовательный центр «Физика твердотельных наноструктур», ННГУ им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород. ORCID iD 0000-0001-9320-2151.

Фомина Светлана Григорьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, научно-образовательный центр «Физика твердотельных наноструктур», ННГУ им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород. ORCID iD 0000-0003-3898-3228.

Алясова Анна Валерьевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра онкологии, ПИМУ, г. Нижний Новгород. ORCID iD 0000-0003-2621-0359.

Магомедов Магомед Абдулгатурович, хирург-онколог, НОКОД, г. Нижний Новгород. ORCID iD 0000-0002-2578-197X.

Новиков Виктор Владимирович, д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой молекулярной биологии и иммунологии, ННГУ им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород. ORCID iD 0000-0002-0880-6565.

Караулов Александр Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, лаборатория иммунопатологии, Институт молекулярной медицины; кафедра клинической иммунологии и аллергологии, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, г. Москва. ORCID iD 0000-0002-1930-5424.

(✉) Караулов Александр Викторович, e-mail: drkaraulov@mail.ru.

Поступила в редакцию 13.10.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Authors contribution

Krasnogorova N.V. – carrying out of the research, design, analysis and interpretation of the data, drafting of the manuscript. Novikov D.V. – conception and design, critical revision of the manuscript for important intellectual content. Fomina S.G. – acquisition of the data. Novikov V.V. – critical revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript for publication. Alyasova A.V. – significant contribution to the conception of the manuscript. Magomedov M.A. – significant contribution to the conception of the manuscript. Karaulov A.V. – critical revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript for publication.

Authors information

Krasnogorova Natalya V., PhD Student, Department of Molecular Biology and Immunology, Junior Researcher, Research and Education Centre for Physics of Solid State Nanostructures, UNN, Nizhny Novgorod, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8800-4553.

Novikov Dmitry V., PhD, Assistant Professor, Leading Researcher, Research and Education Centre for Physics of Solid State Nanostructures, UNN, Nizhny Novgorod, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-9320-2151.

Fomina Svetlana G., PhD, Senior Researcher, Research and Education Centre for Physics of Solid State Nanostructures, UNN, Nizhny Novgorod, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3898-3228.

Alyasova Anna V., DM, Professor, Oncology Department, PRMU, Nizhny Novgorod, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2621-0359.

Magomedov Magomed A., Surgeon-Oncologist, Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncology Center, Nizhny Novgorod, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-2578-197X.

Novikov Viktor V., DBSc, Professor, Head of the Department of Molecular Biology and Immunology, UNN, Nizhny Novgorod, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-0880-6565.

Karaulov Alexander V., DM, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Laboratory for Immunopathology, Department of Clinical Immunology and Allergy, Sechenov First Moscow Medical University, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1930-5424.

(✉) Karaulov Alexander V., e-mail: drkaraulov@mail.ru.

Received 13.10.2018

Accepted 17.12.2018

Моноциты, β -лимфоциты и дендритные клетки при риновирус-индуцированном обострении бронхиальной астмы

Хаитов Р.М.¹, Никонова А.А.^{1,2}, Хаитов М.Р.¹

¹ ГНЦ Институт иммунологии
Россия, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24

² Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток (НИИВС) им. И.И. Мечникова
Россия, 105064, г. Москва, Малый Казенный пер., 5а

РЕЗЮМЕ

Цель. Цель работы заключалась в определении количества различных популяций клеток периферической крови у пациентов с бронхиальной астмой (БА) и здоровых индивидуумов до и во время экспериментальной риновирусной инфекции.

Материалы и методы. Экспериментальная инфекция риновирусом 16-го типа (РВ16) была индуцирована у добровольцев, не имеющих антител к РВ16. Мононуклеары периферической крови от 8 пациентов с легкой персистирующей БА (LPA), 12 с персистирующей БА средней тяжести (PAST) и 6 здоровых добровольцев (норма), полученные за 14 сут до заражения и на 4-е сут после заражения, исследовались методом проточной цитометрии. В-клетки идентифицировали как CD19⁺. Моноциты классифицировали как CD19⁻, МНСII, CD14^{high}. Клетки, охарактеризованные как МНСII, CD14^{neg-low}, далее классифицировали как плазмоцитоидные (pDC) (CD123⁺) и миелоидные (mDC) дендритные клетки (CD11c^{high}).

Результаты. Не выявлено различий между разными группами добровольцев по содержанию моноцитов, mDC и pDC в образцах крови до инфицирования. Однако мы обнаружили повышение уровня В-клеток в крови пациентов с БА по сравнению со здоровыми добровольцами ($p < 0,05$). Также на 4-е сут после заражения РВ16 мы выявили снижение количества циркулирующих pDC в крови пациентов с БА (LPA и PAST) по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,05$).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о повышенном миграционном потенциале циркулирующих pDC при обострении вирус-индуцированных осложнений БА. Отсутствие изменений в количестве mDC во время инфекции мы объясняем тем, что разные популяции DC мигрируют к участкам аллергического воспаления в разные временные интервалы.

Ключевые слова: бронхиальная астма, риновирус, дендритные клетки, В-клетки.

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

Источник финансирования. Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-10188).

Соответствие принципам этики. Для проведения клинического исследования было получено разрешение этической комиссии №09/Н0712/59. Работа проводилась на базе клиники Имперского колледжа Лондона (г. Лондон, Великобритания).

Благодарности. Авторы выражают благодарность профессору Себастьяну Джонсону (Имперский колледж Лондона, г. Лондон, Великобритания) за любезно предоставленные для исследования образцы крови.

✉ Никонова Александра Александровна, e-mail: aa.nikonova@nrcii.ru.

Для цитирования: Хаитов Р.М., Моноциты, β -лимфоциты и дендритные клетки при риновирус-индуцированном обострении бронхиальной астмы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 228–236. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-228-236](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-228-236).

УДК 616.248-036.65-022.1:612.017

[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-228-236](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-228-236)

Monocytes, B-cells and dendritic cells during rhinovirus-induced asthma exacerbation

Khaitov R.M.¹, Nikonova A.A.^{1,2}, Khaitov M.R.¹

¹*Institute of Immunology*

24, Kashirskoye Sh., 115478, Moscow, Russian Federation

²*Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera*

5a, Malyj Kazennyj Per., 105064, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. In this study we aimed to investigate circulating blood cells during experimental virus-induced asthma exacerbation vs baseline.

Materials and methods. Rhinovirus 16 (RV16) experimental infections were induced in RV16-seronegative moderate and mild atopic asthmatic and healthy non-atopic subjects. PBMC from 8 mild, 12 moderate asthmatics and 6 normal subjects obtained at baseline (14 day) and at day 4 after infection with RV16 were analyzed by flow cytometry. B-cells were identified as CD19⁺. Monocytes were identified as MHC II, CD14^{high} cells. The MHC II, CD14^{neg-low} cells were further classified by CD123 and CD11c expression into myeloid DC (CD11c^{high}, mDC), plasmacytoid DC (CD123⁺, pDC).

Results. There were no differences at baseline in frequencies of blood monocytes, mDC and pDC in asthmatic compared to normal subjects, but we found increased amount of B-cells in asthma group ($p < 0.05$). At day 4 after RV16 infection we found decreased percentages of pDC in both moderate and mild asthmatics ($p < 0.05$) compared to baseline.

Conclusion. These data suggest an increased migratory potential of circulating pDCs during virus-induced asthma exacerbation. In patients with asthma pDCs could be recruited to the airways. It is possible that the distinct subsets of DCs may be recruited at different time points to the effector sites of allergic inflammation.

Key words: bronchial asthma, rhinovirus, dendritic cells, B-cells.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out with the financial support of the grant from the Russian Science Foundation (project No. 16-14-10188).

Conformity with the principles of ethics. The permission was obtained from the Ethical Commission No. 09 / H0712 / 59 to conduct a clinical study. The study was carried out at the Imperial College London clinic (London, UK).

Acknowledgements. The authors would like to thank Prof. Sebastian Johnston (Imperial College, London, Great Britain) for providing the blood samples for the research.

For citation: Khaitov R.M., Nikonova A.A., Khaitov M.R. Monocytes, B-cells and dendritic cells during rhinovirus-induced asthma exacerbation. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 228–236. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-228-236](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-228-236).

ВВЕДЕНИЕ

Антигенпрезентирующие клетки (АПК) играют ключевую роль в развитии адекватного иммунного ответа. В отличие от других АПК, таких как моноциты, макрофаги и В-лимфоциты, дендритные клетки (DC) специализируются на презентации антигенов и инициации дифференцировки наивных CD4 и CD8 Т-клеток [1]. В периферической крови были идентифицированы две основных группы DC: миелоидные (mDC) и плазмацитоидные (pDC) [2]. У человека pDC обнаруживаются в периферической крови, миндалинах, спинномозговой жидкости и слизистой оболочке носа, у пациентов с аллергией – после местного введения аллергена [3, 4]. Они часто ассоциируются с патологическими состояниями, такими как системная красная волчанка [5], злокачественными асцитами у больных с карциномой яичников [6] и воспалительными заболеваниями кожи [7].

Интерфероны I типа (ИФН- α/β) – это семейство цитокинов с потенциальной противовирусной активностью. Следует отметить, что pDC являются основным источником ИФН α при стимуляции вирусами [8] и они мигрируют в дыхательные пути при развитии острых респираторных вирусных инфекций [9, 10]. Вирусные инфекции респираторного тракта являются самой распространенной причиной обострения бронхиальной астмы (БА) [11]. Специфический механизм развития таких осложнений до сих пор не известен, однако многочисленные исследования указывают на дефицитный иммунный ответ у пациентов с БА, в частности у них отмечается сниженная продукция противовирусных ИФН I типа [12].

В связи с вышесказанным цель нашей работы заключалась в определении количества разных популяций клеток периферической крови (моноцитов, В-лимфоцитов, pDC и mDC) у больных БА и здоровых индивидуумов до и во время экспериментальной риновирусной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная инфекция PB16 типа проводилась на добровольцах, не имеющих антител к PB16 типа (некурящие, возраст 18–55 лет). В экспериментах принимали участие: 6 здоровых добровольцев (норма); 20 пациентов с диагностированной БА, из них 8 с легкой персистирующей БА (прием ингаляционных бета-2-агонистов короткого действия) – LPA; 12 с персистирующей БА средней тяжести (стероидозависимая астма) – PAST. У каждого из добровольцев дважды про-

водили отбор проб крови: за 14 сут до экспериментального заражения PB16 (D-14) и на 4-е сут после заражения (D4).

Успешной экспериментальная вирусная инфекция считалась в том случае, если у добровольцев появлялись антитела к PB16 и (или) в случае обнаружения РНК PB16 в бронхоальвеолярном лаваже или назальных смывах. Экспериментальные данные, полученные от добровольцев, у которых не выявлено ни одного из перечисленных факторов, были исключены из анализа данных, полученных на 4-е сут после экспериментального заражения.

Исследование образцов методом проточной цитометрии. Образцы крови собирали в специализированные пробирки BD Vacutainer® CPT™ Mononuclear Cell Preparation Tube – Sodium Heparin, которые позволяют сепарировать мононуклеары от цельной крови непосредственно в самой пробирке и избежать дополнительных манипуляций с образцами. Моноциты периферической крови, полученные у добровольцев до и после экспериментальной PB16-инфекции, исследовались методом проточной цитометрии. Для того чтобы исключить мертвые клетки из анализа, использовался набор The LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit (Invitrogen).

Неспецифическое связывание антител предотвращали инкубацией клеток (15 мин, 4 °C) в среде, содержащей 10% человеческой сыворотки. Далее каждый образец инкубировали в течение 30 мин при 4 °C в 100 мкл буфера для проточной цитометрии (фосфатно-солевой буфер, содержащий 2% фетальной сыворотки коров и 10 mM EDTA) с флуоресцентно мечеными антителами к поверхностным антигенам. В работе была использована следующая панель антител: CD19-APC-Cy7 (клон HIB19), CD14-Pacific Blue (клон 1A4), HLA-DR-Qdot 605 (клон Tü36), CD11c- Alexa Fluor 700 (клон 3.9), CD123-PE (клон 6H6). Все антитела предварительно титровали для определения оптимальной рабочей концентрации. После инкубации с антителами клетки фиксировались 2%-м раствором параформальдегида. Для анализа клеток использовался прибор D LSR II (BD Biosciences). Анализ полученных данных выполняли при помощи программного обеспечения lowJo software version 7.6.3 (Tree Star). Результаты выражали в виде процента количества положительных клеток. Для определения логических ограничений в качестве контроля использовали способ Fluorescence Minus One, подразумевающий, что в пробе присутствуют все

планируемые флуорохромы, кроме одного. Для настроек компенсации использовали BD™ CompBeads.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism version 4.0. Данные считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация разных популяций клеток в образцах крови методом проточной цитометрии. Алгоритм анализа количества популяций клеток в образцах крови представлен на рис. 1. Для идентификация pDC и mDC использовался метод исключения. Первичный анализ популяций лейкоцитов проводили с помощью диаграммы

бокового – прямого (SS – FS) светорассеяния (рис. 1, *a*). Таким образом по морфологии клеток была выделена популяция мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Затем были дискриминированы слипшиеся клетки (дуплеты) и выделены популяции одинарных клеток singlets1 и singlets2 (рис. 1, *b*, *c*), а также дискриминирована популяция мертвых клеток (рис. 1, *d*) и выделена популяция живых клеток (live). Далее (рис. 1, *e*) мы идентифицировали популяции CD19+ (В-клетки) и CD19– (не В-клетки). Среди не В-клеток мы идентифицировали (рис. 1, *f*) популяцию моноцитов (monocytes MHC II, CD14high) и не моноцитов (non monocytes MHC II, CD14neg-low). Среди последних мы идентифицировали (рис. 1, *g*) популяции pDC (CD123 high) и mDC (CD11c high).

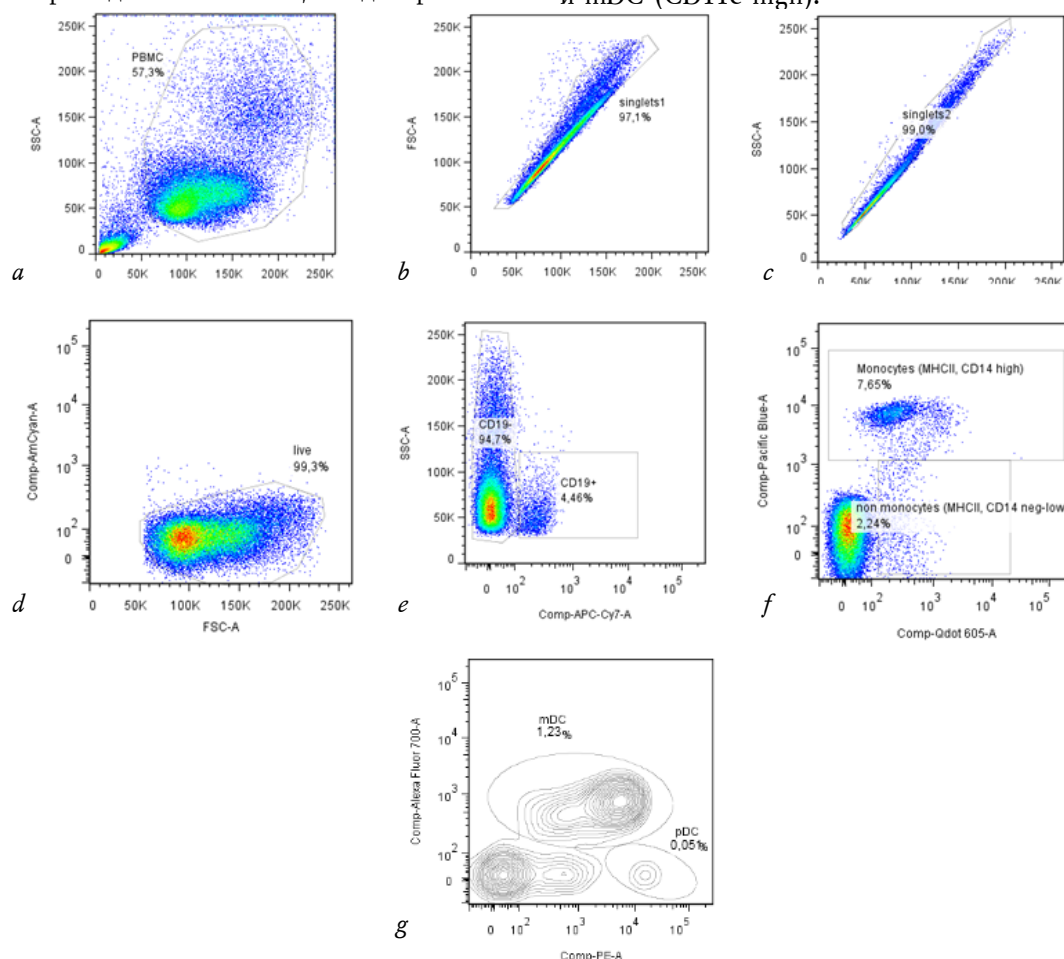


Рис. 1. Алгоритм идентификации иммунных клеток среди мононуклеаров периферической крови: *a* – идентификация целевых клеток с помощью диаграммы бокового – прямого (FS – SS) светорассеяния; *b*, *c* – дискриминация дуплетов; *d* – мертвые клетки из анализа; *e* – популяция В-клеток CD19+; *f* – моноциты (CD19–, MHC II, CD14high); *g* – среди клеток, охарактеризованных как (CD19–, MHC II, CD14neg-low), идентифицировали популяции pDC (CD123 high) и mDC (CD11c high)

Fig.1. Gating strategy to identify immune cells in PBMC: *a* – after gating on target cells based on FSC vs SSC plot; *b*, *c* – gating on siglet cells; *d* – live cells; *e* – B-cells were identified as CD19+; *f* – monocytes were identified as MHC II, CD14high cells; *g* – the MHC II, CD14neg-low cells were further classified into mDC and pDC by plotting them on CD123 vs CD11c plot. The mDC and pDC are the CD11c high and the CD123 subpopulations, respectively

Оценка количества разных популяций клеток в образцах крови до и после экспериментальной инфекции РВ16. При оценке количества моноцитов периферической крови и миелоидных дендритных клеток (mDC) у разных групп пациентов мы не выявили достоверных различий между группами пациентов до и после экспериментальной инфекции (данные не представлены). Однако мы выявили достоверную разницу в количестве В-клеток между группой пациентов с персистирующей БА средней тяжести (PAST) и группой здоровых добровольцев ($p < 0,05$) на исходном уровне до экспериментальной инфекции (D-14) (рис. 2, а). Эта разница и достоверно большее количество В-клеток ($p < 0,05$) также наблюдаются при сравнении общего количества больных БА (Asthma = LPA + PAST) с группой «норма» (рис. 2, б).

На 4-е сут после экспериментального заражения (D4) мы наблюдали тенденцию к увеличению количества В-лимфоцитов в группе пациентов с легкой персистирующей БА (LPA) по сравнению с группой «норма» ($p = 0,055$) (рис. 2, в), которая также сохраняется при сравнении общего количества пациентов с БА и группой «норма» ($p = 0,08$) (рис. 2, д). Далее мы оценили содержание В-клеток в пределах каждой из изучаемых групп до и после инфекции (рис. 2, е–г), но не выявили существенных изменений.

Особый интерес для нас представляла популяция плазмоцитоидных дендритных клеток (pDC). При сравнении количества pDC между группами на исходном уровне и на 4-е сут после заражения мы не обнаружили достоверных различий по этому показателю (рис. 3, а–д). Однако при сравнении количества pDC внутри каждой группы пациентов до и после экспериментального инфицирования РВ16 мы выявили достоверное снижение количества pDC в крови пациентов с LPA и PAST после заражения вирусом (рис. 3, е, ф) ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для достижения цели нашего исследования нам прежде всего предстояло отработать методику идентификации разных популяций клеток, а именно моноцитов, В-лимфоцитов, pDC и mDC в образцах крови методом многопараметрической проточной цитометрии. Для этого мы использовали подходы, описанные в статьях Р. Autissier и соавт. [13] и Д. Blimkie и соавт. [14], а именно популяции идентифицировались методом исключения или negative gating. Алгоритм создания логических ограничений представлен на рис. 1 и описан в разделе «Материалы и методы».

Однако следует отметить, что так же, как и авторов одной из упомянутых публикаций [14], мы столкнулись с незначительным присутствием фракции CD19+ клеток в популяции моноцитов, mDC и pDC. Можно предположить, что некоторые не В-клетки могут экспрессировать CD19 и (или) некоторые В-клетки могут экспрессировать CD11c, CD14 и (или) CD123, что и объясняет присутствие CD19+ клеток среди моноцитов, mDC pDC.

При анализе популяций клеток мы не выявили различий в количестве моноцитов периферической крови и mDC между группами пациентов. Однако в крови пациентов с БА было обнаружено большее количество В-клеток. Как уже было отмечено, для идентификации В-лимфоцитов мы использовали маркер CD19. Он экспрессируется на В-клетках с самых ранних стадий развития: от предшественников В-клеток до их терминальной дифференцировки в плазматические клетки или фолликулярные дендритные клетки. Кроме того, CD19 играет важную роль в активации В-клеток [15]. Известно, что в патогенезе БА ключевую роль играют Th2- и Th17-клетки, которые дифференцируются из наивных Т-клеток под действием сигналов от дендритных клеток. В свою очередь, Th2-клетки индуцируют продукцию IgE В-клетками посредством стимуляции интерлейкинами (IL) 4 и 13. В связи с этим увеличенное количество В-лимфоцитов в крови пациентов с БА выглядит логичным и согласуется с данными других исследователей [16, 17], которые также отмечают повышение уровня В-клеток памяти, плазматических клеток, продуцирующих IgE, у пациентов с астмией. Следует отметить, что мы не обнаружили влияния вирусной инфекции на количество В-клеток в крови у добровольцев из разных групп.

При анализе содержания pDC мы не выявили различий между группами добровольцев, однако на 4-е сут после заражения отмечалось достоверное снижение количества pDC у пациентов с БА как в группе с LPA, так и в группе с PAST. Мы предполагаем, что это связано с повышенным миграционным потенциалом циркулирующих pDC при обострении вирус-индуцированных осложнений БА. У пациентов с БА pDC могут мигрировать в дыхательные пути к очагу воспаления. Схожие данные были получены в работе Е. Silver, в которых отмечено дефицитное количество pDC в крови детей с БА, перенесших инфекцию респираторно-синцитиальным вирусом, однако в данном исследовании не изучалось количество pDC у этих детей до заражения [18].

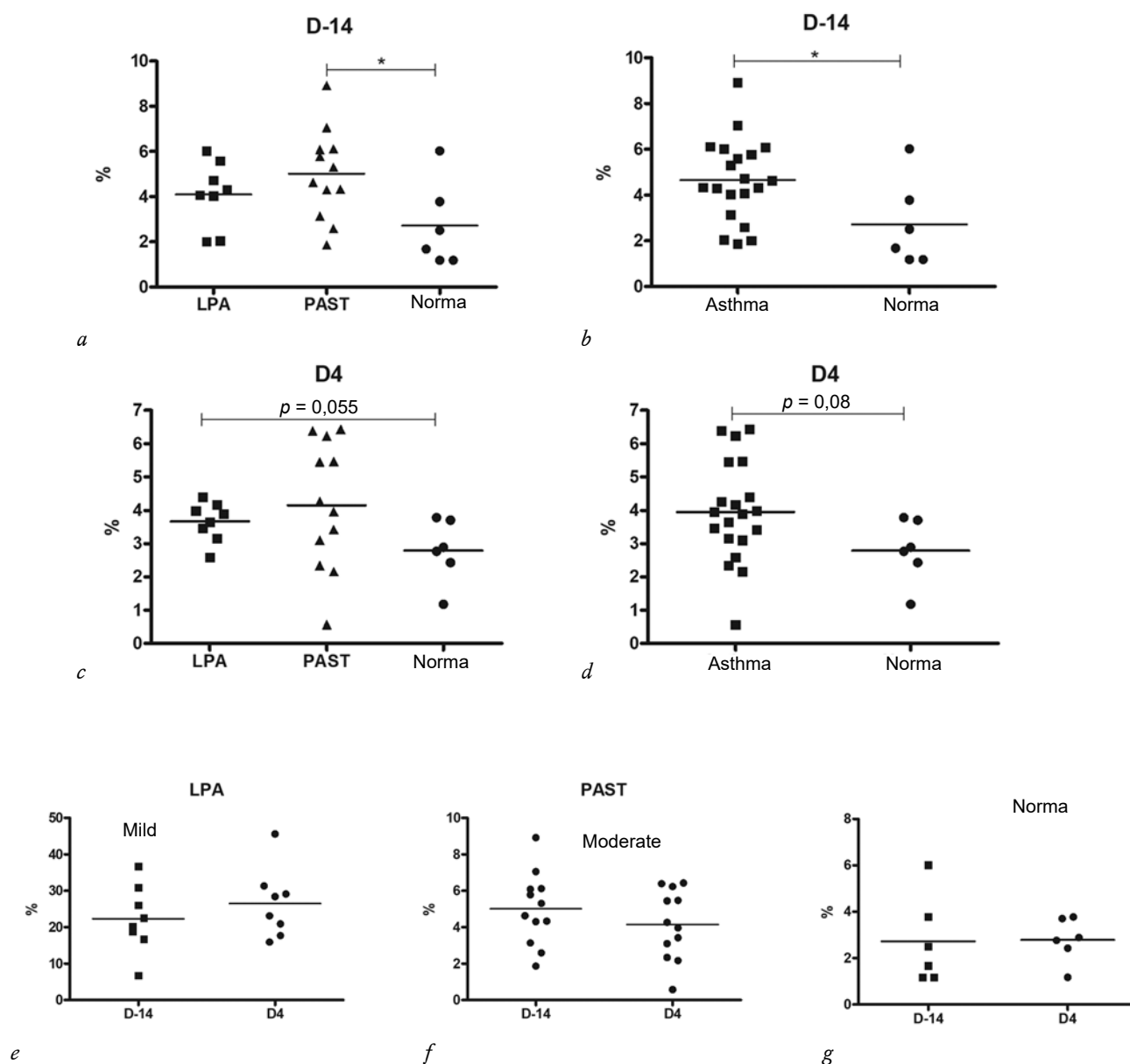
В-клетки
B-cells

Рис. 2. Содержание В-клеток в образцах крови больных бронхиальной астмой до и на 4-е сут после экспериментального заражения риновирусом 16-го типа (PB16), %: LPA – легкая персистирующая бронхиальная астма, PAST – персистирующая бронхиальная астма средней тяжести, Asthma (LPA + PAST), Norma – группа здоровых добровольцев, D-14 – отбор крови за 14 сут до экспериментального заражения PB16, D4 – на 4-е сут после заражения (здесь и далее). Группы сравнивали между собой (*a–d*), также проводили сравнение внутри каждой из групп (*e–g*) до и после заражения PB16

Fig. 2. Percentage of B-cells in blood samples of different groups of patients at baseline and day 4 post experimental rhinovirus 16 infection (RV16), %: mild – persistent mild bronchial asthma, moderate – persistent moderate bronchial asthma, Asthma group (mild + moderate), norma – healthy subjects, D-14 – blood samples taken on baseline, D4 – on day 4 after experimental infection with RV16 (here and elsewhere)

The groups were compared with each other (*a–d*), and within each group (*e–g*) on baseline and day 4 after infection with RV16

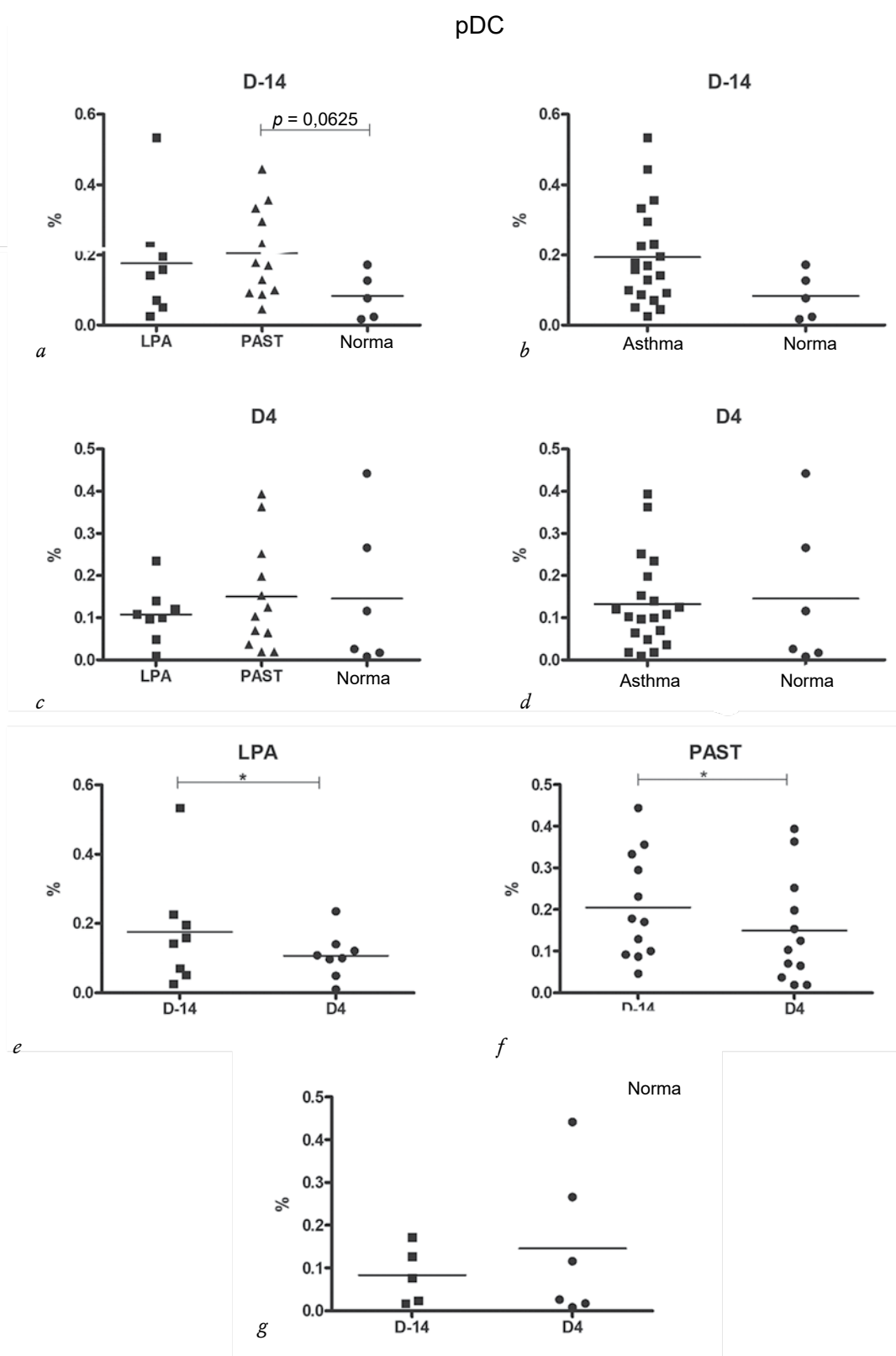


Рис. 3. Содержание плазмацитоидных клеток (pDC) в образцах крови больных бронхиальной астмой до и на 4-е сут после экспериментального заражения риновирусом 16-го типа, %

Fig. 3. Percentage of plasmacytoid dendritic cells (pDC) in blood samples of different groups of patients at baseline and day 4 post experimental rhinovirus 16 infection

Отсутствие изменений в количестве mDC во время инфекции можно объяснить тем, что разные популяции DC мигрируют к участкам аллергического воспаления в разные моменты времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенных работ мы изучили содержание моноцитов, В-лимфоцитов, pDC и mDC у больных БА и здоровых индивидуумов до и во время экспериментальной риновирусной инфекции. Полученные данные о повышенном содержании В-клеток и снижении количества pDC в крови пациентов в БА согласуются с данными других исследователей и свидетельствуют о различиях в течении инфекции у пациентов с БА и здоровых добровольцев. Однако для формирования более конкретных выводов необходимо проведение дополнительных исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rissoan M.C., Soumelis V., Kadowaki N., Grouard G., Briere F., de Waal Malefyt R., Liu Y.J. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*. 1999; 283 (5405): 1183–1186. DOI: 10.1126/science.283.5405.1183.
2. O'Doherty U., Peng M., Gezelter S., Swiggard W.J., Betjes M., Bhardwaj N., Steinman R.M. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology*. 1994; 82 (3): 487–493.
3. Pashenkov M., Huang Y.M., Kostulas V., Haglund M., Soderstrom M., Link H. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain*. 2001; 124 (Pt. 3): 480–492. DOI: 10.1093/brain/124.3.480.
4. Summers K.L., Hock B.D., McKenzie J.L., Hart D.N. Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. *Am. J. Pathol.* 2001; 159 (1): 285–295. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61694-X.
5. Farkas L., Beiske K., Lund-Johansen F., Brandtzaeg P., Jahnsen F.L. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- α /beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am. J. Pathol.* 2001; 159 (1): 237–243. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61689-6.
6. Zou W., Machelon V., Coulomb-L'Hermin A., Borvak J., Nome F., Isaeva T., Wei S., Krzysiek R., Durand-Gaselin I., Gordon A., Pustilnik T., Curiel D.T., Galanaud P., Capron F., Emilie D., Curiel T.J. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med.* 2001; 7 (12): 1339–1346. DOI: 10.1038/nm1201-1339.
7. Wollenberg A., Wagner M., Gunther S., Towarowski A., Tuma E., Moderer M., Rothenfusser S., Wetzel S., Endres S., Hartmann H. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* 2002; 119 (5): 1096–1102. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.19515.x.
8. Liu Y.J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Ann. Rev. Immunol.* 2005; 23: 275–306. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115633.
9. Gill M.A., Long K., Kwon T., Muniz L., Mejias A., Connolly J., Roy L., Banichereau J., Ramilo O. Differential recruitment of dendritic cells and monocytes to respiratory mucosal sites in children with influenza virus or respiratory syncytial virus infection. *J. Infect. Dis.* 2008; 198 (11): 1667–1676. DOI: 10.1086/593018.
10. Grayson M.H., Ramos M.S., Rohlfing M.M., Kitchens R., Wang H.D., Gould A., Agapov E., Holtzman M.J. Controls for lung dendritic cell maturation and migration during respiratory viral infection. *J. Immunol.* 2007; 179 (3): 1438–1448. DOI: 10.4049/jimmunol.179.3.1438.
11. Gern J.E., Rosenthal L.A., Sorkness R.L., Lemanske R.F., Jr. Effects of viral respiratory infections on lung development and childhood asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115 (4): 668–674. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.01.058.
12. Gill M.A. The role of dendritic cells in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 129 (4): 889–901. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.02.028.
13. Autissier P., Soulas C., Burdo T.H., Williams K.C. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A*. [Evaluation Studies Research Support, N.I.H., Extramural]. 2010; 77 (5): 410–419. DOI: 10.1002/cyto.a.20859.
14. Blimkie D., Fortuno E.S., Thommai F., Xu L., Fernandes E., Crabtree J., Rein-Weston A., Jansen K., Brinkman R. R., Kollmann T. R. Identification of B cells through negative gating—An example of the MIFlowCyt standard applied. *Cytometry A*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010; 77 (6): 546–551. DOI: 10.1002/cyto.a.20862.
15. Noh J., Noh G. Allergen-specific responses of CD19(high) and CD19(low) B Cells in Non-IgE-mediated food allergy of late eczematous reactions in atopic dermatitis: presence of IL-17- and IL-32-producing regulatory B cells (Br17 & Br32). *Inflamm. Allergy Drug Targets*. 2012; 11 (4): 320–329. DOI: 10.2174/187152812800959022.
16. Heeringa J.J., Rijvers L., Arends N.J., Driessen G.J., Pasmans S.G., van Dongen J.J.M., de Jongste J.C., van Zelm M. C. IgE-expressing memory B cells and plasmablasts are increased in blood of children with asthma, food allergy, and atopic dermatitis. *Allergy*. 2018; 73 (6): 1331–1336. DOI: 10.1111/all.13421.
17. Luo J., Guo H., Liu Z., Peng T., Hu X., Han M., Yang X., Zhou H., Li H. Analysis of Peripheral B Cell Subsets in Patients With Allergic Rhinitis. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2018; May; 10 (3): 236–243. DOI: 10.4168/aaair.2018.10.3.236.
18. Silver E., Yin-DeClue H., Schechtman K.B., Grayson M.H., Bacharier L.B., Castro M. Lower levels of plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood are associated with a diagnosis of asthma 6 yr after severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2009; 20 (5): 471–476. DOI: 10.1111/j.1399-3038.2008.00818.x.

Сведения об авторах

Хаитов Рахим Мусаевич, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель Института иммунологии, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-3064-8871.

Никонова Александра Александровна, канд. биол. наук, зав. лабораторией, НИИВС им. И.И. Мечникова, г. Москва. ORCID iD 0000-0001-9610-0935.

Хаитов Муса Рахимович, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Института иммунологии, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-4961-9640.

(✉) Никонова Александра Александровна, e-mail: aa.nikonova@nrcii.ru.

Поступила в редакцию 28.09.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Authors information

Khaitov Rahim M., DM, Professor, Academician RAS, Research Advisor of Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3064-8871.

Nikonova Alexandra A., PhD, Head of the Laboratory, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-9610-0935.

Khaitov Musa R., DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Director of Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-4961-9640.

(✉) Nikonova Alexandra A., e-mail: aa.nikonova@nrcii.ru.

Received 28.09.2018

Accepted 17.12.2018

Тучные клетки и сперматогенез в норме и при повреждении

Храмцова Ю.С.^{1,2}, Арташян О.С.^{1,2}, Тюменцева Н.В.^{1,3}, Юшков Б.Г.^{1,2,3}, Бухарина А.Ю.²

¹ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН)
Россия, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

² Уральский федеральный университет (УрФУ)
Россия, 620002, г. Екатеринбург, ул. Мифа, 19

³ Институт медицинских клеточных технологий
Россия, 620026, г. Екатеринбург, ул. К. Маркса, 22а

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – изучить взаимосвязь между состоянием тучных клеток (мастоцитов, или лаброцитов) семенников и сперматогенезом в норме и при различных типах повреждения тестикул.

Материалы и методы. Исследования проводились на 35 самцах крыс линии Вистар. Использовали две экспериментальные модели повреждения семенников: прокол и компрессию. Для изучения взаимосвязи сперматогенеза и состояния тучных клеток (ТК) использовали морфологические и морфометрические методы исследования. Для оценки функционального состояния тестикул хемилюминесцентным методом проводили исследование уровня общего тестостерона в крови.

Результаты. При различных повреждениях тестикул в органе развиваются схожие деструктивные процессы, характеризующиеся наличием некротизированных канальцев, семенных шаров, снижением количества клеток сперматогенного эпителия, увеличением числа нефункционирующих канальцев, а также изменением ряда морфометрических показателей. Реакция ТК на различные виды повреждения проявляется в усилении их функциональной активности. Так, после прокола на фоне уменьшения количества ТК происходит активация их синтетической функции, в то время как при сдавлении ТК отвечают не только повышением функциональной активности, но и увеличением их числа в органе.

Заключение. Нарушение сперматогенеза при различных травмах семенника сопровождается усилением функциональной активности ТК независимо от характера повреждения. Однако увеличение количества ТК в органе происходит только при сохранении гематотестикулярного барьера. Поскольку нормальный сперматогенез осуществляется на фоне достаточно высокой синтетической активности ТК, то эту реакцию повышенного синтеза и дегрануляции можно рассматривать как компенсаторную.

Ключевые слова: мастоциты, лаброциты, семенники, механическая травма.

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

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (тема № ААА-А-А18-118020590108-7).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальной этической комиссией ИИФ УрО РАН (протокол № 10 от 03.04.2017).

✉ Храмцова Юлия Сергеевна, e-mail: hramtsova15@mail.ru.

Для цитирования: Храмцова Ю.С., Арташян О.С., Тюменцева Н.В., Юшков Б.Г., Бухарина А.Ю. Тучные клетки и сперматогенез в норме и при повреждении. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 237–246. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-237–246](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-237-246).

УДК 616.98:578.28HIV]-085.37:616-097
[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-237–246](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-237-246)

Interrelation of mast cells with spermatogenesis in norm and in case of damage

Khramtsova Yu.S.^{1,2}, Artashyan O.S.^{1,2}, Tyumentseva N.V.^{1,3}, Yushkov B.G.^{1,2,3}, Bukharina A. Yu.²

¹ Institute of Immunology and Physiology, Russian Academy of Sciences (IIP, RAS)
106, Pervomayskaya Str., Yekaterinburg, 620049, Russian Federation

² Ural Federal University (UFU)
19, Mir Str., Yekaterinburg, 620002, Russian Federation

³ Institute of Medical Cell Technologies
22A9, Str. K. Marks, Yekaterinburg, 620002, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to study the relationship between the condition of mast cells of testes and spermatogenesis in normal and with various types of testicular damage.

Materials and methods. The studies were carried out on male rats of the Wistar line. Two experimental models of testicular damage were used puncture and compression. Morphological and morphometric methods of investigation were used to study the relationship between spermatogenesis and mast cells. To assess the functional state of the testicles by chemiluminescence, a study was made of the level of total testosterone in the blood.

Results. The similar destructive processes develop in the testicle with various injuries, characterized by the presence of necrotic tubules, seed balls, a decrease in the number of spermatogenic epithelial cells, an increase in the number of non-functioning tubules, and a change in a number of morphometric parameters. The reaction of mast cells to various types of damage is manifested in the enhancement of their functional activity. So after a puncture against the background of a decrease in the number of mast cells activation of their synthetic function occurs, while in squeezing the cells respond not only with an increase in functional activity, but also with an increase in their number in the organ.

The conclusion. Disturbance of spermatogenesis in various injuries of the testis is accompanied by activation of the functional activity of mast cells, regardless of the nature of the damage. However, the increase in the number of mast cells in the body occurs only with the preservation of the blood–testis barrier. Since normal spermatogenesis is carried out against the background of a sufficiently high synthetic activity of mast cells, this reaction of increased synthesis and degranulation can be considered as compensatory.

Key words: mast cells, testis, injury.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The work was carried out as part of the government contract of the Institute of Immunology and Physiology, Russian Academy of Sciences (topic No. AAAA-A18-118020590108-7).

Conformity with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Institute of Immunology and Physiology, Russian Academy of Sciences (Protocol No. 10 of 03.04.2017).

For citation: Khramtsova Yu.S., Artashyan O.S., Tyumentseva N.V., Yushkov B.G., Bukharina A.Yu. Interrelation of mast cells with spermatogenesis in norm and in case of damage. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 237–246. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-237–246](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-237-246).

ВВЕДЕНИЕ

Тучные клетки (ТК), также известные как мастоциты или лаброциты, являются неотъемлемым компонентом ткани семенника, что предполагает их регуляторную роль в поддержании тестикулярного гомеостаза. Существуют убедительные доказательства того, что провоспалительные цитокины ТК (интерлейкины (ИЛ) 1 и 6, фактор некроза опухоли альфа (TNF α)) играют важную роль в развитии и функционировании яичек млекопитающих, оказывая влияние на дифференциацию клеток сперматогенного эпителия и стероидогенез в физиологических условиях, участвуя в апоптозе половых клеток в нормальном семеннике [1–4]. Известно, что мужское бесплодие часто сопровождается увеличением ТК в семеннике и наблюдается отчетливая отрицательная корреляция между такими показателями, как количество ТК и состояние сперматогенеза. ТК обладают потенциалом для нарушения функции яичка в условиях иммунной активации за счет содержания медиаторов воспаления, сериновых протеаз и цитокинов. При этом ТК могут влиять не только на процессы расстройства сперматогенеза, но и способствовать развитию фиброза и хронических воспалительных реакций в семеннике, а также оказывать влияние на репаративную регенерацию тестикул [1, 3, 5, 6].

Общепризнанно, что при механическом повреждении тестикул наблюдается выраженная реакция со стороны различных элементов иммунной системы, в том числе ТК. Однако неизвестно, как на эту реакцию влияют характер повреждения и сохранение гематотестикулярного барьера (ГТБ). В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение взаимосвязи между состоянием ТК семенников и сперматогенезом в норме и при различных типах повреждения тестикул.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 35 самцах половозрелых крыс линии Вистар. Условия содержания и обращение с используемыми в эксперименте животными соответствовали Директиве Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации.

Поскольку тестикулы являются иммунопривитизированными органами, важную роль при их повреждении приобретают сохранность и состояние ГТБ. В связи с этим для повреждения тестикул использовали два метода: прокол и компрессию одного из семенников. Прокол семенника проводили по короткой оси органа насквозь стерильной иглой диаметром 3 мм с последующим на-

ложением шва на поврежденный участок. Такое воздействие характеризовалось нарушением целостности всех оболочек яичка и ГТБ. Компрессию осуществляли путем сдавливания всего органа щипцами с силой 15 Н в течение 3 с без нарушения целостности оболочек. Все хирургические манипуляции проводили под действием диэтилового эфира. В дальнейшем животных выводили из экспериментов через 7 и 30 сут после операции путем передозировки эфирного наркоза.

Экспериментальные животные были распределены на три основные группы: первая группа – интактные животные ($n = 7$), вторая группа – животные, подвергшиеся проколу семенника ($n = 7$, через 7 сут; $n = 7$, через 30 сут), третья – крысы, подвергшиеся компрессии тестикула ($n = 7$, через 7 сут; $n = 7$, 30 сут). Функциональную активность семенников оценивали по уровню общего тестостерона в крови хемилюминесцентным методом на анализаторе DVIA Centaur XP (Siemens, Германия).

Для гистологического исследования брали семенники, которые предварительно взвешивали на измерительных весах (A&D Company Ltd., GF-200, Япония), затем фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина. После стандартной гистологической проводки на автомате закрытого типа Shandon Excelsior (MICROM International GmbH, Германия) материал заливали в парафин с помощью станции для заливки биологических тканей парафином EG 1160 (Leica, Германия). После этого полученные парафиновые блоки нарезали на полуавтоматическом микротоме Thermo scientific Microm HM 450 (MICROM International GmbH, Германия), толщина срезов семенников составляла 4–5 мкм. Морфологические исследования проводили на гистологических препаратах семенников, окрашенных гематоксилином и эозином с помощью светового микроскопа (Leica DM 5000 B, Германия), оснащенного камерой (Leica DFC 490, Германия).

Сперматогенез оценивали по следующим показателям: средний индекс сперматогенеза, среднее число сперматогоний в канальце, количество нефункционирующих канальцев, соотношение общего числа клеток сперматогенного эпителия (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды) к общему числу sustentocитов. Индекс сперматогенеза I рассчитывали на поперечном срезе семенника по 4-балльной системе (с учетом количества слоев сперматогенного эпителия каждого извитого семенного канальца) и в дальнейшем определяли по формуле $I = \sum a/A$, где a – количество слоев сперматогенного эпителия, A – количество подсчитанных извитых семенных канальцев [7].

Подсчет ТК в семенниках проводили на единицу площади 1 мм² после окраски препаратов толуидиновым синим (бета-метахроматическое окрашивание гранул в фиолетовый цвет), азуром II (ортохроматическое окрашивание гранул в ярко-синий цвет). При оценке синтетической активности ТК классифицировали на четыре типа [8]. К типу 1 относили клетки с малым содержанием гранул секрета в цитоплазме, который располагался околочелювочно. Тип 2 – клетки с хорошо дифференцированной гранулярностью в цитоплазме, четко контурированным ядром и диффузным расположением гранул. Тип 3 – крупные клетки с плотным и диффузным расположением гранул в цитоплазме, которые придавали ей гомогенный вид. К типу 0 относили дегранулированные клетки с признаками нарушения целостности клеточной мембраны и выделения в окружающее тканевое пространство цитоплазматических гранул.

Вычисляли средний гистохимический коэффициент (СГК) по формуле J. Astaldi, L.Verga [9]: $СГК = (3_N + 2_N + 1_N + 0_N) / 100$, где 3_N , 2_N , 1_N и 0_N – соответственно число клеток типа 3, 2, 1 или 0 согласно классификации, приведенной выше, 100 – общее число подсчитанных клеток в группе. Для оценки функциональной активности по выбросу гранул ТК в межклеточное пространство использовали индекс дегрануляции (ИД, %), который рассчитывали по формуле: $ИД = Д / (Д + Н) \times 100$, где Д – число ТК с явными признаками дегрануляции, Н – число неактивированных ТК.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием непараметрических методов статистики (Statistica 6.1). Данные представляли в виде $M \pm m$, где M – выборочное

среднее, m – ошибка среднего. Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна – Уитни. Различия между показателями в разных группах считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Семенник здоровых крыс состоит из извитых семенных канальцев, окруженных соединительной тканью, обильно пронизанной кровеносными и лимфатическими сосудами, в которой кроме обычных клеточных элементов (макрофагов, фибробластов и др.) имеются интерстициальные эндокринные клетки. Гистологический анализ выявил отсутствие в интактных семенниках канальцев со сдвигивающимся эпителием, что можно связать с активными процессами сперматогенеза в ткани здорового яичка (рис. 1, табл. 1).

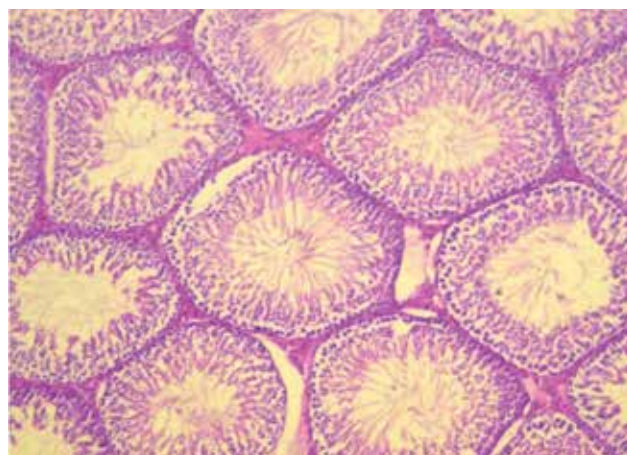


Рис. 1. Гистологическая структура интактного семенника. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 1. Histological structure of the intact testis. Staining with hematoxylin and eosin, $\times 100$

Т а б л и ц а 1
Table 1

Морфометрические показатели семенников после прокола или сдавливания, $M \pm m$ Morphometric parameters of testes after puncture or compression, $M \pm m$					
Показатель Parameter		Индекс сперматогенеза J , усл. ед. Spermatogenesis index J , units	Число клеток сперматогенного эпителия/ число sustentocytes Number of seminiferous epithelial cells/ number of Sertoli cells	Число сперматогониев в одном канальце Number of spermatoblasts in one tubule	Число нефункционирующих семенных канальцев Number of non-functioning seminiferous tubules
Группа 1 (интактные) Group 1 (intact)		3,89 ± 0,01	12,58 ± 0,12	79,95 ± 3,6	0
Группа 2, 7-е сут	Неповрежденный семенник Undamaged testis	2,74 ± 0,35*	11,53 ± 0,43	78,85 ± 3,81	0
	Поврежденный семенник Damaged testis	2,80 ± 0,21*	8,42 ± 0,31*	69,55 ± 2,31*	0

Продолжение табл. 1
End of table 1

Показатель Parameter		Индекс сперматогенеза J , усл. ед. Spermatogenesis index J , units	Число клеток сперматогенного эпителия/ число сустентоцитов Number of seminiferous epithelial cells/ number of Sertoli cells	Число сперматогониев в одном канальце Number of spermatoblasts in one tubule	Число нефункционирующих семенных канальцев Number of non-functioning seminiferous tubules
Группа 2, 30-е сут	Неповрежденный семенник Undamaged testis	$2,97 \pm 0,21$	$8,92 \pm 0,55^{*}\#$	$71,52 \pm 2,73$	0
	Поврежденный семенник Damaged testis	$2,08 \pm 0,23^{*}$	$7,0 \pm 0,53^{*}$	$69,32 \pm 2,44^{*}$	$33,80 \pm 14,80^{*}\#$
Группа 3, 7-е сут	Неповрежденный семенник Undamaged testis	$3,74 \pm 0,03^{*}$	$12,53 \pm 0,28$	$76,7 \pm 1,9$	0
	Поврежденный семенник Damaged testis	$3,33 \pm 0,14^{*}$	$15,29 \pm 0,23^{*}$	$75,92 \pm 2,9$	$0,8 \pm 0,58$
Группа 3, 30-е сут	Неповрежденный семенник Undamaged testis	$3,62 \pm 0,03^{*}$	$12,09 \pm 0,40$	$77,9 \pm 2,75$	0
	Поврежденный семенник Damaged testis	$3,41 \pm 0,10^{*}$	$11,77 \pm 0,77\#$	$68,24 \pm 1,4^{*}$	$1,0 \pm 0,32^{*}$

* данные достоверны по сравнению с группой интактных животных, $p < 0,05$; # данные достоверны по сравнению с 7-ми сут, $p < 0,05$ (U -критерий, здесь и в табл. 2, 3).

* data are statistically significant as opposed to the group of intact animals, $p < 0.05$; # data are statistically significant as opposed to the data at day 7, $p < 0.05$ (Mann-Whitney U -test, here and in Tables 2 and 3).

ТК интактного семенника имеют неправильную или веретеновидную форму, располагаются в основном вокруг сосудов и в небольшом количестве между извитых семенных канальцев. В

белочной оболочке визуально содержится большое количество ТК, которые имеют вытянутую уплощенную форму, за счет чего гранулы в цитоплазме просматриваются слабо (рис. 2).

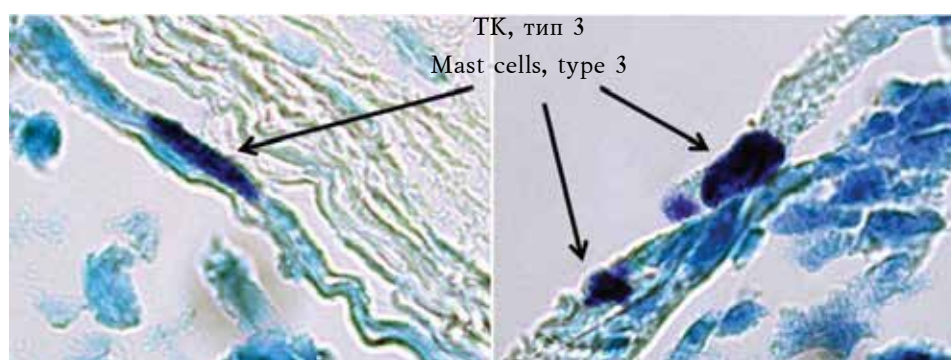


Рис. 2. Тучные клетки интактного семенника крысы. Окраска азуром II, $\times 1\,000$

Fig. 2. Mast cells of the intact testis of rat. Staining with azure II, $\times 1\,000$

При анализе функционального состояния ТК установлено, что преобладающим типом являются ТК с плотным расположением гранул в цитоплазме – тип 3. Немного реже встречаются клет-

ки с диффузной гранулярностью и в состоянии активной дегрануляции.

Прокол семенника, при котором нарушается целостность всех оболочек яичка и ГТБ, на 7-е сут

сопровождался снижением весового индекса как поврежденного ($6,24 \pm 0,25$ до $4,01 \pm 0,25$), так и неповрежденного семенника по сравнению с интактной группой ($6,24 \pm 0,25$ до $3,7 \pm 0,47$). Однако содержание тестостерона в сыворотке крови оставалось на уровне интактных животных (табл. 2).

В органе обнаружены интенсивно развивающиеся деструктивные изменения, проявляющиеся в появлении некротизированных канальцев, формировании в некоторых из них так называемых

ваемых семенных шаров – крупных структур с множественными, часто пикнотичными ядрами или их фрагментами с интенсивно окрашенной цитоплазмой, которые образуются за счет слияния сперматид в сперматогенном эпителии и в ходе последующего их отторжения в просвет извитых семенных канальцев, а также снижения количества клеток сперматогенного эпителия и отсутствия сперматозоидов в части канальцев (рис. 3).

Т а б л и ц а 2
Table 2

Уровень сывороточного тестостерона у экспериментальных животных после прокола и компрессии семенника, нмоль/л, $M \pm m$			
Serum testosterone level in experimental animals after puncture and compression of the testis, nmol/l, $M \pm m$			
Срок после повреждения, сут Time after damage, day	Группа 1 (интактные) Group 1 (intact)	Группа 2 (прокол) Group 2 (puncture)	Группа 3 (компрессия) Group 3 (compression)
7 сут Day 7	$12,87 \pm 2,13$	$12,02 \pm 2,61$	$15,33 \pm 5,86$
30 сут Day 30		$14,39 \pm 1,21$	$5,54 \pm 1,47^{*}\#$

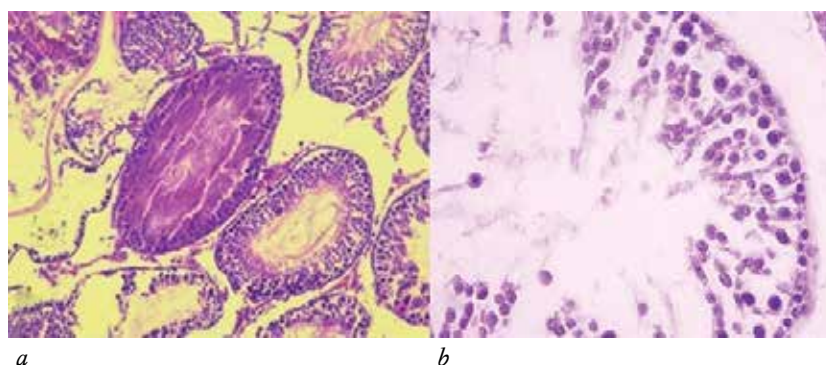


Рис. 3. Гистологическая структура семенников после прокола, 7-е сут: *a* – извитой семенной каналец с некрозом, окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$; *b* – снижение количества клеток сперматогенного эпителия в извитых семенных канальцах, окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig.3. Histological structure of testes after puncture, 7 days: *a* – convoluted seminal tubule with necrosis, staining with hematoxylin and eosin, $\times 100$; *b* – reduction in the number of spermatogenic epithelial cells in the convoluted seminal tubules, staining with hematoxylin and eosin, $\times 400$

Анализ состояния ТК семенника после прокола выявил, что, хотя общее количество этих клеток на единицу площади достоверно не изменялось, индекс дегрануляции и синтетическая активность увеличивались по сравнению с контролем (табл. 3). Наблюдалось небольшое увеличение клеток с высоким содержанием гранул в цитоплазме. Количество клеток с малым содержанием гранул и клеток с дифференцированной гранулярностью не изменялось.

К 30-м сут после прокола весовой индекс семенников был снижен и оставался на уровне 7-х сут, что может быть связано с падением числа клеток сперматогенного эпителия. Отмечалось ухудшение сперматогенеза, проявляющееся в

опустошении значительного количества извитых семенных канальцев и, соответственно, в увеличении количества нефункционирующих структур (см. табл. 1). Кроме этого, увеличивалось число извитых семенных канальцев с некрозом (рис. 4).

При этом общее количество ТК уменьшалось и становилось достоверно ниже показателей интактного органа. Преобладающими типами клеток поврежденного семенника на данном сроке являлись клетки с плотным, диффузным содержанием гранул (тип 3), что свидетельствует о повышении синтетической активности. Индекс дегрануляции тучных клеток снижался до показателя интактных животных (см. табл. 3).

Т а б л и ц а 3

T a b l e 3

Характеристика тучных клеток (ТК) семенника крыс после повреждения, $M \pm m$			
Characteristic of mast cells of the testis of rats after injury, $M \pm m$			
Показатель Parameter	Число ТК/1 мм ² Number of mast cells/1 mm ²	Средний гистохимический коэффициент ТК, % Average histochemical coefficient of mast cells, %	Индекс дегрануляции ТК, % Degranulation index of mast cells, %
Группа 1 Group 1	43,00 $\pm$ 0,06	1,62 $\pm$ 0,06	11,2 $\pm$ 1,3
Группа 2, 7-е сут Group 2, day 7	38,0 $\pm$ 2,1	1,81 $\pm$ 0,02*	15,2 $\pm$ 0,7*
Группа 2, 30-е сут Group 2, day 30	33,5 $\pm$ 1,2*	2,14 $\pm$ 0,06*#	10,00 $\pm$ 1,47
Группа 3, 7-е сут Group 3, day 7	67,5 $\pm$ 2,2*	1,92 $\pm$ 0,05*	17,2 $\pm$ 0,8*
Группа 3, 30-е сут Group 3, day 30	49,0 $\pm$ 3,1#	1,68 $\pm$ 0,09#	15,8 $\pm$ 0,9*

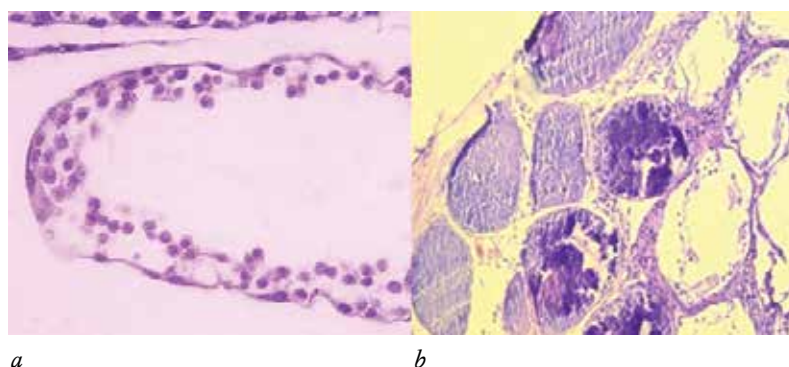


Рис. 4. Гистологическая структура семенников после прокола, 30-е сут: *a* – опустошенные канальцы, окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$; *b* – канальцы с некрозом, окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 4. Histological structure of testes after puncture, 30 days: *a* – devastated tubules, staining with hematoxylin and eosin, $\times 400$; *b* – tubules with necrosis, staining with hematoxylin and eosin, $\times 100$

Сдавление семенника является травмой, при которой не происходит нарушения целостности оболочек семенника, но при этом воздействию подвергается весь орган, и повреждающее действие распространяется как на извитые семенные канальцы, и, соответственно, структуру их ГТБ, так и на интерстициальные эндокринные клетки, сосуды и чувствительную паренхиму яичка. В семенниках на 7-е сут после сдавления в целом отмечались сходные изменения с теми, что наблюдали после прокола. Снижался весовой индекс поврежденного семенника (с $6,24 \pm 0,25$ до $5,09 \pm 0,15$). Развивались деструктивные процессы, снижалось количество клеток сперматогенного эпителия в извитых семенных канальцах, появлялись

канальца с некрозом и отмечалось отсутствие сперматозоидов в некоторых из них.

Развитие деструктивных процессов после компрессии подтверждалось и морфометрическими данными. Происходило нарушение процессов образования половых клеток конечных стадий сперматогенеза, что отражалось на среднем индексе сперматогенеза, который падал в обоих семенниках. Отмечалось сокращение количества sustentocytov в поврежденном семеннике, но данные изменения не затрагивали контралатеральный орган. Нефункциональные канальцы появляются лишь в незначительном количестве (см. табл. 1). Уровень тестостерона в сыворотке крови оставался на уровне интактных животных (см. табл. 2).

После сдавления в семенниках количество ТК возрастало, повышались гистохимический коэффициент и индекс дегрануляции (см. табл. 3). ТК по большей части локализованы вокруг сосудов оболочки семенника, но обнаруживались и в интерстициальном пространстве (рис. 5).

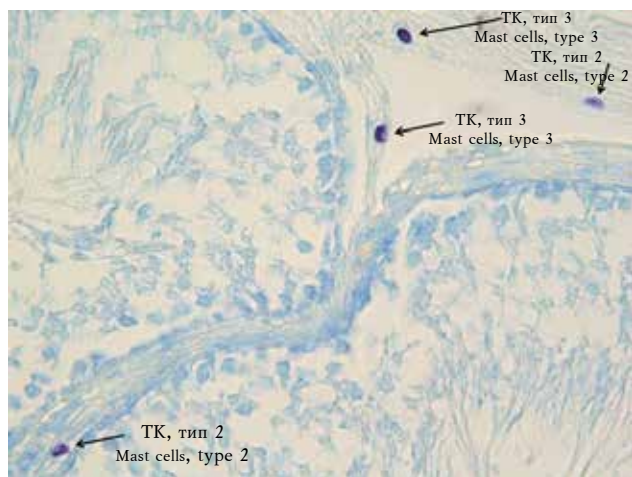


Рис. 5. Тучные клетки в семеннике после тупой травмы, 7-е сут. Окраска толуидиновым синим, $\times 400$

Fig. 5. Mast cells in testicle after compression, 7 days. Staining with toluidine blue, $\times 400$

На 30-е сут после сдавления весовой индекс обоих семенников возвращался к показателям интактных животных. На гистологических препаратах сохранялась картина, аналогичная изменениям на 7-е сут, – отсутствовали сперматозоиды в части извитых семенных канальцев, выпадали клетки сперматогенного эпителия в просвет канальца, возможно, за счет утрачивания связи с sustentocytes, и на месте погибших таким образом сперматоцитов в эпителии канальцев появлялись полости округлой формы. Снижалось количество сперматогоний (см. табл. 1). Это свидетельствует о снижении регенераторного потенциала органа. Кроме этого, наблюдалось резкое падение содержания тестостерона в крови (см. табл. 2). Данные изменения, возможно, связаны с повреждением интерстициальных эндокринных клеток вследствие сдавления органа и их последующим разрушением на поздний срок, а также снижением активности этих клеток в неповрежденном органе.

Количество ТК в семенниках уменьшалось до соответствующего уровня у интактных животных. Их синтетическая активность возвращалась к нормальным показателям, в то время как индекс дегрануляции оставался повышенным на уровне 7-х сут (см. табл. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют, что для нормального сперматогенеза необходимо наличие в органе ТК с высокой секреторной активностью 3-го типа. При повреждении тестикул взаимоотношения между ТК и сперматогенезом существенно изменяются. Эти нарушения зависят от характера повреждения и сохранности ГТБ.

После различных видов повреждения происходит развитие сходных интенсивных процессов деструкции органа в ранние сроки как после прокола, так и после компрессии. Это проявляется в изменении ряда морфометрических показателей. Показано снижение среднего индекса сперматогенеза, что демонстрирует нарушение процессов образования половых клеток конечных стадий сперматогенеза. Отмечается сокращение числа клеток сперматогенного эпителия в извитых семенных канальцах. Это может быть связано либо с повреждением целостности структуры канальцев и выходом половых клеток в интерстициальное пространство, либо запускающимися процессами апоптоза.

Кроме этого в поврежденных семенниках снижается количество сперматогониев. Эти клетки являются наиболее устойчивыми к действию различных повреждающих факторов и отражают регенераторный потенциал семенника, так как именно они являются клетками сперматогенного эпителия, дающими начало всем последующим стадиям сперматогенеза. Следовательно, снижение их количества свидетельствует о достаточно глубоких нарушениях в семеннике. На фоне отмеченных изменений функциональная активность органа не изменяется.

Несмотря на схожие изменения в семенниках, реакция ТК зависит от характера повреждения органа. Через 7 сут после прокола семенника количество ТК не изменяется, однако при этом увеличивается их синтетическая и секреторная активность. После компрессии увеличивается количество клеток в семеннике и происходит усиление их функциональной активности. Таким образом, нарушения сперматогенеза развиваются на фоне увеличения функциональной активности ТК. При сохранении ГТБ реакция ТК выражена более значительно, чем при его повреждении.

К 30-м сут наблюдения дегенеративные изменения в семенниках нарастают. При этом в случае сдавления падает и их эндокринная функция по выработке тестостерона. Реакция ТК выявляет четкие различия в зависимости от вида трав-

мы. Так, после прокола на фоне уменьшения количества ТК происходит активация их синтетической функции, а уровень дегрануляции снижается до показателя интактных животных. При сдавлении же восстанавливается количество ТК, но их дегрануляционная активность остается повышенной.

Нарушения сперматогенеза при различных травмах семенника сопровождаются активацией функциональной активности ТК независимо от характера повреждения. Однако увеличение количества ТК в органе происходит только при сохранении ГТБ. Поскольку нормальный сперматогенез осуществляется на фоне достаточно высокой синтетической активности ТК, то эту реакцию повышенного синтеза и дегрануляции можно рассматривать как компенсаторную.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Welter H., Köhn F.M., Mayerhofer A. Mast cells in human testicular biopsies from patients with mixed atrophy: increased numbers, heterogeneity, and expression of cyclooxygenase 2 and prostaglandin D2 synthase. *Fertil. Steril.* 2011; 96 (2): 309–313. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.035.
2. Pérez C.V., Theas M.S., Jacobo P.V., Jarazo-Dietrich S., Guazzone V.A., Lustig L. Dual role of immune cells in the testis: Protective or pathogenic for germ cells? *Spermatogenesis*. 2013; 3 (1): e23870. DOI: 10.4161/spmg.23870.
3. Windschüttl S., Nettersheim D., Schlatt S., Huber A., Welter H., Schwarzer J.U., Köhn F.M., Schorle H., Mayerhofer A. Are testicular mast cells involved in the regulation of germ cells in man? *Andrology*. 2014; 2 (4): 615–622. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2014.00227.x.
4. Haidl G., Duan Y.G., Chen S.J., Köhn F.M., Schuppe H.C., Allam J.P. The role of mast cells in male infertility. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 2014; 7 (5): 627–634.
5. Apa D.D., Cayan S., Polat A., Akbay E. Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. *Arch. Androl.* 2002; 48 (5): 337–344.
6. Yunzhi X., Guangjie C. Mast cell and autoimmune diseases. *Mediators of Inflammation*. 2015; Article ID 246126, 8 pages. DOI: 10.1155/2015/246126.
7. Внуков П.В. Новый способ оценки атрофических изменений яичка. *Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья*. 2007; 27: 32–37. [Vnukov P.V. A new estimation method of the atrophic changes in the testicle. *Scientific Medical Journal of the Central Chernozemye*. 2007; 27: 32–37 (in Russ.).]
8. Юшков Б.Г., Черешнев В.А., Климин В.Г., Арташян О.С. Тучные клетки. Физиология и патофизиология. М.: Медицина, 2011: 240. [Yushkov B.G., Chereshev V.A., Klimin V.G., Artashyan O.S. Mast cells. Physiology and pathophysiology. Moscow: Medicine Publ., 2011: 240 (in Russ.).]
9. Astaldi G., Verga Z. The glycogen content of the cells of lymphatic leukemia. *Haemat.* 1957; 17: 129–135. DOI: 10.1159/000205237.

Вклад авторов

Храмцова Ю.С., Арташян О.С., Бухарина А.Ю. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. Тюменцева Н.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Юшков Б.Г. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Authors contribution

Khramtsova Yu.S., Artashyan O.S., Bukharina A. Yu. – conception and design, analysis and interpretation of data. Tyumentseva N.V. – critical revision of the manuscript for important intellectual content. Yushkov B.G. – final approval of the manuscript for publication.

Сведения об авторах

Храмцова Юлия Сергеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория иммунофизиологии и иммунофармакологии, ИИФ УрО РАН; доцент, Департамент биологии и фундаментальной медицины, УрФУ, г. Екатеринбург, Россия.

Арташян Ольга Сергеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория иммунофизиологии и иммунофармакологии, ИИФ УрО РАН; доцент, Департамент биологии и фундаментальной медицины, УрФУ, г. Екатеринбург, Россия.

Тюменцева Наталья Валерьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория иммунофизиологии и иммунофармакологии, ИИФ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Authors information

Khramtsova Yulia S., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, IIP, RAS; UFU, Yekaterinburg, Russian Federation.

Artashyan Olga S., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, IIP, RAS; UFU, Yekaterinburg, Russian Federation.

Tyumentseva Natalia V., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, IIP, RAS, Yekaterinburg, Russian Federation.

Yushkov Boris G., DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, IIP, RAS; UFU; Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation.

Юшков Борис Германович, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, зав. лабораторией иммунофизиологии и иммунофармакологии, ИИФ УрО РАН; профессор, Департамент биологии и фундаментальной медицины, УрФУ; Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург, Россия.

Бухарина Анна Юрьевна, магистр, Департамент биологии и фундаментальной медицины, УрФУ, г. Екатеринбург, Россия.

(✉) **Храмцова Юлия Сергеевна**, e-mail: hramtsova15@mail.ru.

Bukharina Anna Yu., Master, Department of Biology and Fundamental Medicine, UFU, Yekaterinburg, Russian Federation.

(✉) **Khramtsova Yulia S.**, e-mail: hramtsova15@mail.ru.

Received 03.05.2018

Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 03.05.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Субпопуляционный состав регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов с ВИЧ-инфекцией при эффективной антиретровирусной терапии

Черешнев В.А.^{1,2,3}, Сайдакова Е.В.^{1,2}, Королевская Л.Б.¹, Шмагель Н.Г.^{1,4}, Шмагель К.В.^{1,2}

¹ Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН)
Россия, 614081, г. Пермь, ул. Ленина, 13а

² Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ)
Россия, 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

³ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН)
Россия, 620049, г. Екатеринбург ул. Первомайская, 106

⁴ Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (Центр СПИД)
Россия, 614065, г. Пермь, ул. Архитектора Связева, 21

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Причина, по которой у инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) пациентов, получающих высокоактивную антиретровирусную терапию (АРТ), сохраняется повышенный уровень активации иммунной системы, остается не до конца понятной. Регуляторные Т-лимфоциты способны контролировать иммунную активацию, однако под влиянием инфекционного процесса их количество может изменяться.

Цель. Оценка численности и субпопуляционного состава регуляторных Т-лимфоцитов ВИЧ-позитивных пациентов, принимающих эффективную АРТ.

Материалы и методы. Количество CD4⁺ Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺) и регуляторных Т-клеток (Treg; CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺) определяли методом проточной цитофлуориметрии. Субпопуляционный состав регуляторных Т-лимфоцитов оценивали по уровню экспрессии FOXP3. Состояние активации Т-клеток устанавливали по одновременной экспрессии молекул CD38 и HLA-DR.

Результаты. Показано, что по сравнению со здоровыми людьми у ВИЧ-позитивных больных наблюдается дефицит CD4⁺ Т-лимфоцитов: их численность остается сниженной, несмотря на эффективную АРТ. Вместе с тем абсолютное количество регуляторных CD4⁺ Т-клеток у зараженных ВИЧ людей падает незначительно. Более того, основная доля Treg в их крови представлена лимфоцитами с высоким уровнем экспрессии FOXP3, что соответствует фенотипу клеток, обладающих наибольшей супрессорной активностью. Однако на этом фоне в крови ВИЧ-инфицированных лиц сохраняется повышенное относительное количество активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Заключение. У ВИЧ-инфицированных пациентов, которым была своевременно назначена терапия и у которых лечение привело к эффективному подавлению вирусной нагрузки ВИЧ и удовлетворительному приросту числа периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов, поддерживается сравнительно большой пул периферических регуляторных Т-клеток. Однако этих лимфоцитов оказывается недостаточно для полного контроля над иммунной активацией, развивающейся на фоне хронической лентивирусной инфекции.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, антиретровирусная терапия, CD4⁺ Т-лимфоциты, иммунная активация, регуляторные Т-клетки.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-54-30006.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (протокол № 31 от 02.03.2017, IRB00008964).

Для цитирования: Черешнев В.А., Сайдакова Е.В., Королевская Л.Б., Шмагель Н.Г., Шмагель К.В. Субпопуляционный состав регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов с ВИЧ-инфекцией при эффективной антиретровирусной терапии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 247–256. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-247-256>.

УДК 616.98:578.28HIV]-085.37:616-097
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-247-256>

Regulatory T-lymphocyte subsets in patients with HIV-infection receiving highly active antiretroviral therapy

Chereshnev V.A.^{1,2,3}, Saidakova E.V.^{1,2}, Korolevskaya L.B.¹, Shmagel N.G.^{1,4}, Shmagel K.V.^{1,2}

¹ Perm Federal Research Center Ural Branch Russian Academy of Sciences
13a, Lenin Str., Perm, 614990, Russian Federation

² Perm State University
15, Bukirev Str., Perm, 614990, Russian Federation

³ Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences
106, Pervomayskaya Str., Yekaterinburg, 620049, Russian Federation

⁴ Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases
21, Sviyazeva Str., Perm, 614065, Russian Federation

ABSTRACT

Background. The reason why HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) suffer from the increased immune activation remains elusive. Regulatory T-cells (Treg) are able to control immune activation, but their quantity may vary due to the infection. The aim of this work was to estimate the number and subsets of Tregs in HIV-positive patients receiving virologically effective HAART.

Materials and methods. The CD4⁺ T-lymphocyte (CD3⁺CD4⁺) and Treg (CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺) quantities were determined by flow cytometry. Treg subsets were assessed based on the FOXP3 expression level. The state of T-cell activation was established according to the simultaneous expression of CD38 and HLA-DR molecules.

Results. It was shown that HIV-positive patients compared to healthy people have reduced CD4⁺ T-lymphocyte counts despite virologically effective HAART. At the same time in HIV-infected people, Treg absolute numbers were only slightly decreased. Moreover, the major part of Treg pool in their blood consisted of lymphocytes with a high level of FOXP3 expression that corresponded to the phenotype of cells with the highest suppressor activity. However, an increased relative amount of activated CD4⁺ T-lymphocytes was retained in the HIV-infected individuals' blood.

Conclusion. In HIV-infected patients who received HAART in time and whose treatment resulted in an effective HIV viral load suppression and a satisfactory CD4⁺ T-cell counts increase, a relatively large pool of peripheral Tregs is maintained. However, these lymphocytes are not enough to fully control immune activation that develops against the background of chronic lentivirus infection.

Key words: HIV infections, antiretroviral therapy, highly active; CD4-positive T-lymphocytes, lymphocyte activation; T-lymphocytes, regulatory.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This work was supported by the RFBR grant No. 17-54-30006.

Compliance with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases (Protocol No. 31 of 02.03.2017, IRB00008964).

For citation: Chereshev V.A., Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Shmagel N.G., Shmagel K.V. Regulatory T-lymphocyte subsets in patients with HIV-infection receiving highly active antiretroviral therapy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 247–256. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-247-256>.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время хроническая иммунная активация рассматривается в качестве ведущей причины развития иммунодефицита и синдрома приобретенного иммунодефицита у инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) больных [1]. Степень активации иммунной системы позволяет прогнозировать скорость опустошения пула CD4⁺ Т-лимфоцитов и смерть пациентов более точно, чем любой другой показатель, включая количество вируса в крови зараженных [1, 2]. Хотя высокоактивная антиретровирусная терапия (АРТ) вызывает снижение иммунной активации у ВИЧ-инфицированных субъектов [3], лечение не способно привести данный показатель к уровню здоровых людей [4], а сохраняющаяся иммунная активация влечет за собой сокращение продолжительности жизни больных. Причина поддержания высокого уровня активации иммунной системы у получающих терапию ВИЧ-инфицированных лиц остается не до конца понятной.

Регуляторные Т-лимфоциты (Treg) способны контролировать активацию клеток врожденного и адаптивного иммунитета, что определяет их важную роль в сохранении гомеостаза иммунной системы [5]. Дефицит Treg приводит к увеличению уровня иммунной активации и может вызвать развитие таких заболеваний, как ревматоидный артрит, диабет 1-го типа, миастения, аутоиммунный гепатит и т.д. [6]. Необходимо отметить, что Treg являются одной из субпопуляций CD4⁺ Т-клеток. Как и хелперные Т-лимфоциты, регуляторные клетки могут быть инфицированы ВИЧ [7]. Более того, так как у ВИЧ-позитивных больных развивается дефицит CD4⁺ Т-лимфоцитов, у них следует ожидать и снижение численности Treg. Однако данные об изменениях, происходящих в пуле регуляторных Т-клеток при ВИЧ-инфекции, очень противоречивы. Целью настоящей

работы явилась оценка численности и субпопуляционного состава регуляторных Т-лимфоцитов ВИЧ-позитивных пациентов, принимающих вирусологически эффективную АРТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принял участие 41 человек. Пациенты были разделены на две клинические группы: 1) ВИЧ-инфицированные больные, более 2 лет получающие АРТ ($n = 21$); 2) относительно здоровые добровольцы без признаков ВИЧ-инфекции ($n = 20$). От каждого пациента было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Периферическую кровь объемом до 50 мл забирали натошак из кубитальной вены. Вирусную нагрузку ВИЧ в плазме крови больных определяли методом разветвленной ДНК-гибридизации Versant 3 HIV-1 RNA 3,0 assay b на анализаторе Versant 440 (Siemens, Германия) согласно инструкции производителя. Численность CD4⁺ Т-лимфоцитов крови оценивали с использованием коммерческого набора Immunocytometry Systems (BDIS) Simultest™ (Becton Dickinson, США) на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования периферической крови в градиенте плотности диаколла (1,077 г/мл, Диа-М, Россия). Полученные иммуноциты окрашивали анти-CD3-AF700, анти-CD71-BV421, анти-HLA-DR-FITC, анти-CD38-PE (Becton Dickinson, США), анти-FoxP3-PE (eBioscience™, США), анти-CD4-Qdot605 антителами и красителем LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, США). Активированный статус клеток оценивали по одновременной экспрессии молекул HLA-DR и CD38 на поверхности Т-лимфоцитов. В качестве Treg рассматривали CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺ Т-клетки. Определяли относительное и абсолютное количество

CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim} и CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} субпопуляций Treg. Логика гейтирования регуляторных Т-лимфоцитов, представленная на рис. 1, является модифицированным методом, предложенным М. Miyara и соавт. [8]. Исследование уровня активации иммунной системы и субпопуляционного

состава Treg ВИЧ-инфицированных и здоровых пациентов осуществляли на проточном цитофлуориметре Fortessa (Becton Dickinson, США).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием непараметрических методов.

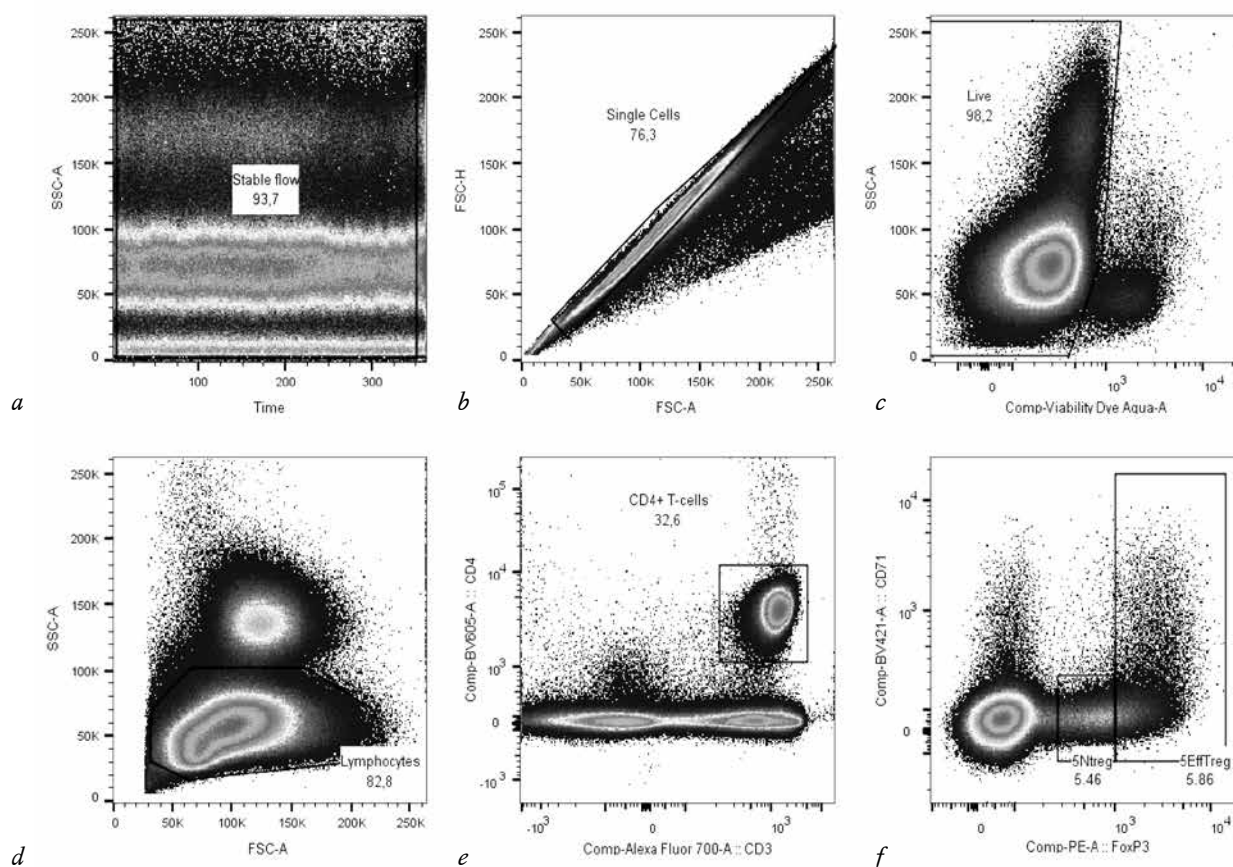


Рис. 1. Логика гейтирования покоящихся и активированных регуляторных Т-лимфоцитов: *a* – определение данных, полученных при стабильном потоке проточной жидкости; *b* – выделение гейта одиночных клеток; *c* – исключение из анализа нежизнеспособных клеток; *d* – определение гейта лимфоцитов; *e* – выделение гейта CD3⁺CD4⁺ Т-клеток; *f* – анализ количества покоящихся (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim}) и активированных (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high}) регуляторных Т-лимфоцитов

Fig. 1. Gating on resting and activated regulatory T-cells: *a* – extracting of stable flow data; *b* – gating on single cells; *c* – exclusion of dead cells from the analysis; *d* – lymphocyte gating; *e* – CD3⁺CD4⁺ T-cell gating; *f* – resting (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim}) and activated (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high}) regulatory T-cell analysis

В выборке рассчитывали медиану и интерквартильный размах $Me (Q_{25}-Q_{75})$ (ИКР: 25–75 перцентиль). Достоверность различий между группами устанавливали с помощью *U*-критерия Вилкоксона – Манна – Уитни. Корреляционный анализ выполняли, рассчитывая коэффициент корреляции рангов Спирмена *r*. Проведение статистических расчетов и построение графиков осуществляли с использованием программ Stata11SE и Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинические характеристики обследованных пациентов суммированы и представлены в таблице.

Группы были сопоставимы по возрасту и половому составу, что позволило исключить влияние этих параметров на получаемые результаты. Вирусная нагрузка ВИЧ в плазме крови всех инфицированных субъектов находилась на уровне ниже порога детекции современных тест-систем (<50 копий/мл).

Т а б л и ц а
T a b l e

Клиническая характеристика пациентов Patients' clinical characteristics		
Показатель Indicator	ВИЧ-инфицированные больные HIV-infected patients	Здоровые добровольцы Healthy volunteers
Обследовано пациентов, <i>n</i> Examined patients, <i>n</i>	21	20
Возраст, годы, <i>Me</i> (Q_{25} – Q_{75}) Age, years	38 (34–42)*	34 (30–40)
Мужчины, % Men, %	43 (9 out of 21)	40 (8 out of 20)
Половой путь передачи ВИЧ, абс. (%) Sexual transmission of HIV, abs. (%)	20 (95)	–
Длительность инфекции, годы, <i>Me</i> (Q_{25} – Q_{75}) Duration of infection, years	10 (6–13)	–
Продолжительность АРТ, годы, <i>Me</i> (Q_{25} – Q_{75}) Duration of ART, years	4,5 (3,2–6,5)	–
Численность CD4 ⁺ Т-клеток до АРТ, мкл ⁻¹ , <i>Me</i> (Q_{25} – Q_{75}) Number of CD4 ⁺ T-cells before ART, mcl ⁻¹	160 (69–185)	–
Численность CD4 ⁺ Т-клеток на момент исследования, мкл ⁻¹ , <i>Me</i> (Q_{25} – Q_{75}) Number of CD4 ⁺ T-cells at the time of the study, mcl ⁻¹	534 (438–656) <i>p</i> < 0,001	878 (778–1231)
Уровень ВИЧ в крови, копии/мл HIV level in blood, copies/ml	< 50**	–

Примечание. ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; АРТ – антиретровирусная терапия.

*медиана и интерквартильный размах, статистические расчеты выполнены по методу Манна – Уитни; ** предел чувствительности тест-систем.

Note. HIV – human immunodeficiency virus; ART – antiretroviral therapy.

*median and interquartile range, statistical calculations done using Mann – Whitney test; ** sensitivity threshold of the test systems.

Несмотря на это, у ВИЧ-позитивных больных по сравнению со здоровыми людьми было повышено относительное количество CD4⁺ Т-лимфо-

цитов, одновременно экспрессирующих молекулы CD38 и HLA-DR, что соответствовало активированному фенотипу клеток (рис. 2).

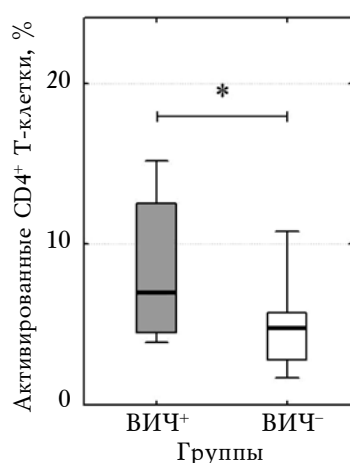


Рис. 2. Активация CD4⁺ Т-лимфоцитов крови у ВИЧ-инфицированных пациентов с подавленной репликацией ВИЧ и здоровых людей: по оси абсцисс – клинические группы, по оси ординат – содержание CD38⁺HLA-DR⁺CD4⁺ Т-клеток в пуле CD4⁺ Т-лимфоцитов. Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), межквартильные интервалы (прямоугольники) и 10–90%-е размахи (вертикальные отрезки). Достоверность различий между группами определялась по методу Манна – Уитни, **p* < 0,05

Fig. 2. CD4⁺ T-cell activation in HIV-infected patients with suppressed viral load and in healthy controls: relative quantities of CD38⁺HLA-DR⁺CD4⁺ T-cells are shown in two patient groups: HIV-positive and HIV-negative. Medians, interquartile ranges, and upper and lower ranges are presented. **p* < 0.05 (Mann – Whitney Test)

Также у ВИЧ-инфицированных лиц по сравнению с пациентами контрольной группы было статистически значимо (*p* < 0,001) снижено число CD4⁺ Т-клеток периферической крови

(рис. 3, а). При этом два параметра были взаимосвязаны: у пациентов, зараженных ВИЧ, была обнаружена обратная корреляционная зависимость между процентным содержанием CD4⁺HLA-

DR⁺CD38⁺ Т-лимфоцитов и абсолютным количеством периферических CD4⁺ Т-клеток ($r = -0,437$; $p < 0,05$). Таким образом, несмотря на подавленную вирусную нагрузку, у ВИЧ-инфицированных больных, принимающих АРТ, со-

храняется активированное состояние иммунной системы, которое может неблагоприятно сказываться на численности периферических CD4⁺ Т-клеток и, как следствие, ускорять развитие заболевания.

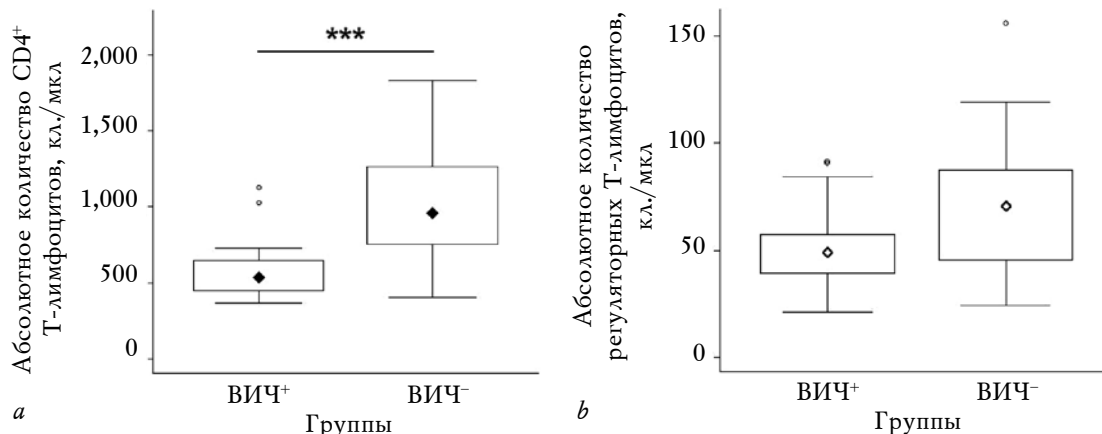


Рис. 3. Абсолютное количество CD4⁺ Т-лимфоцитов и регуляторных Т-клеток в крови ВИЧ-инфицированных пациентов с подавленной репликацией ВИЧ и здоровых людей: по оси абсцисс – клинические группы, по оси ординат – абсолютное количество CD4⁺ Т-лимфоцитов, кл./мкл. Показаны медианы, интерквартильные интервалы, верхние и нижние границы размахов, выпадающие значения. *** $p < 0,001$ (U-тест Манна – Уитни)

Fig. 3. CD4⁺ T-cell and regulatory T-cell absolute counts in the blood of HIV-infected patients with suppressed viral load and in healthy people: relative quantities of CD4⁺ T-cells are shown in two patient groups – HIV-positive and HIV-negative. Medians, interquartile ranges, and upper and lower ranges, and outliers are presented. *** $p < 0.001$ (Mann – Whitney Test)

При исследовании регуляторных Т-лимфоцитов – клеток, способных подавлять иммунную активацию, показано, что их абсолютное количество у ВИЧ-инфицированных пациентов не отличалось статистически значимо ($p > 0,05$) от такового неинфицированных субъектов (рис. 3, б). Вместе с тем были отмечены различия в субпопуляционном составе этих клеток у представителей двух групп. Показано, что у ВИЧ-позитивных субъектов по сравнению с неинфицированными добровольцами развивается дефицит CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim} Т-клеток: их абсолютное количество в крови составило, соответственно, 25 кл./мкл (ИКР: 18–30) и 46 кл./мкл (ИКР: 30–57). Различие между группами было статистически значимо ($p < 0,001$). При этом число CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} Treg не отличалось ($p > 0,05$) у пациентов двух групп: ВИЧ-инфицированные – 26 кл./мкл (ИКР: 19–33); относительно здоровые люди – 25 кл./мкл (ИКР: 20–38). Таким образом, на фоне терапевтически контролируемой ВИЧ-инфекции сокращается размер пула CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim} Т-клеток. В то же время абсолютное количество CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} Treg остается на уровне, характерном для здоровых людей, что обеспечивает сравнительно высокую общую численность регуляторных Т-лимфоцитов

в крови ВИЧ-инфицированных больных, принимающих АРТ.

Важно отметить, что для эффективного контроля над активацией CD4⁺ Т-клеток имеет значение не столько абсолютное количество регуляторных Т-лимфоцитов, сколько их численное соотношение с клетками-мишенями [9]. Поэтому на следующем этапе исследования нами была проведена оценка относительного количества Treg в общем пуле CD4⁺ Т-лимфоцитов. Было показано, что по сравнению со здоровыми людьми у ВИЧ-позитивных пациентов, принимающих АРТ, увеличена доля Treg. Так, у лиц, зараженных ВИЧ, регуляторные Т-клетки составили 9,0% (ИКР: 7,5–11,4), а у людей без ВИЧ-инфекции – 6,8% (ИКР: 5,2–9,7) от численности периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов, $p < 0,02$. У ВИЧ-позитивных субъектов повышенное процентное содержание Treg было обусловлено статистически значимым ($p < 0,001$) увеличением относительного количества клеток CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} субпопуляции (рис. 4). Их доля среди общего пула CD4⁺ Т-лимфоцитов составила 4,4% (ИКР: 3,3–6,5) и 2,7% (ИКР: 2,2–3,8) в группах ВИЧ⁺ и ВИЧ⁻ соответственно. При этом относительное количество

CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim} клеток среди CD4⁺ Т-лимфоцитов не имело статистически значимых отличий ($p > 0,05$) при сравнении их уровней в группах ВИЧ-инфицированных и здоровых людей. Таким образом, у ВИЧ-позитивных лиц, принимающих АРТ, увеличивается относительное количество регуляторных Т-клеток, а именно CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} Т-лимфоцитов.

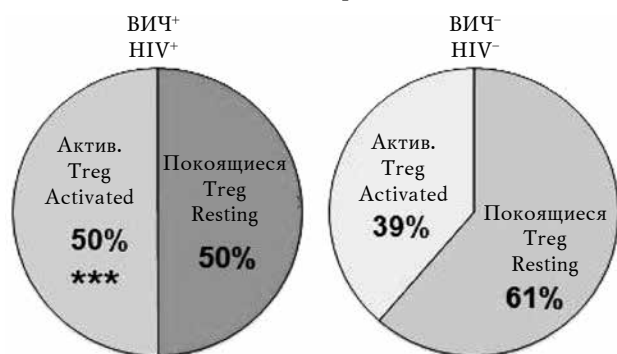


Рис. 4. Распределение регуляторных Т-лимфоцитов между субпопуляциями покоящихся и активированных клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов с подавленной репликацией вируса и здоровых людей: пул регуляторных Т-лимфоцитов (100%) разделен на покоящиеся (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim}) и активированные (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high}) клетки по уровню экспрессии ядерного белка FOXP3. *** $p < 0,001$ (U-тест Манна – Уитни)

Fig. 4. Regulatory T-cell distribution between resting and activated cell subsets in HIV-infected patients with suppressed viral load and in healthy people: regulatory T-cell pool (100%) was divided into resting (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim}) and activated (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high}) lymphocytes according to the FOXP3 expression. *** $p < 0,001$ (Mann – Whitney Test)

ОБСУЖДЕНИЕ

Современные литературные источники предоставляют противоречивые данные о роли регуляторных Т-лимфоцитов в контроле над хронической иммунной активацией при ВИЧ-инфекции. Некоторые работы демонстрируют наличие отрицательной корреляционной связи между количеством Treg и уровнем активации иммунной системы в хроническую стадию заболевания у «наивных» пациентов, не получающих АРТ [10–12]. Другие, напротив, сообщают о прямой зависимости [13, 14] либо ее отсутствии [15, 16] между двумя параметрами. В ряде исследований было показано, что у ВИЧ-позитивных больных, принимающих антиретровирусные препараты, большое процентное содержание регуляторных Т-лимфоцитов ассоциировано с более низким уровнем активации Т-клеток [17, 18]. На основе

этих данных можно заключить, что Treg играют важную роль в контроле над остаточной активацией Т-лимфоцитов у ВИЧ-позитивных пациентов, находящихся на терапии. В то же время этих клеток может быть недостаточно для того, чтобы повлиять на генерализованную иммунную активацию во время хронической, неконтролируемой посредством АРТ, ВИЧ-инфекции [19].

Несоответствие данных, получаемых при исследовании регуляторных Т-лимфоцитов, вероятно, связано с применением различных методологических подходов к определению субпопуляций Treg. В литературе описан целый спектр маркерных молекул, характеризующих те или иные функциональные особенности этой группы лимфоцитов. Среди них CD25, CD127, FOXP3, CD39, CD45RA, CCR4, HLA-DR, CD161 и т.д. [20]. В настоящей работе при определении фенотипа регуляторных Т-клеток нами была использована стратегия, впервые предложенная М. Miyaga и соавт. [8]. В своей работе авторы показали, что регуляторные CD4⁺ Т-лимфоциты можно разделить на две субпопуляции, отличающиеся по экспрессии молекулы FOXP3. Согласно полученным ими данным, CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} субпопуляция представлена регуляторными Т-клетками, среди которых повышено содержание пролиферирующих (Ki-67+) и активированных (HLA-DR+) элементов. Более того, из всех Т-лимфоцитов именно FOXP3^{high} CD4⁺ Т-клетки характеризуются наиболее высоким уровнем экспрессии CTLA-4 – молекулы, участвующей в контроле супрессорной активности Treg [21]. Эта особенность определяет наиболее выраженную по сравнению с другими FOXP3-позитивными клетками, способность CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} Treg подавлять активацию других иммунных клеток [8]. М. Miyaga и соавт. назвали CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} Т-лимфоциты «активированными» регуляторными Т-клетками [8]. В свою очередь, CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim} Т-лимфоциты были определены как «покоящиеся» клетки-предшественники «активированных» Treg [8].

В настоящей работе мы показали, что по сравнению со здоровыми людьми у ВИЧ-позитивных больных, принимающих АРТ, повышено процентное содержание Treg среди CD4⁺ Т-лимфоцитов. Увеличение относительного количества этих клеток было опосредовано повышением доли «активированных» регуляторных Т-лимфоцитов на фоне незначительного снижения процентного содержания «покоящихся» Treg. На наш взгляд, в условиях терапевтически контролируемой ВИЧ-инфекции увеличение относительного количества регуляторных Т-клеток с активированным

фенотипом согласуется с потребностью организма в контроле над активацией иммунной системы. Мы предполагаем, что хроническая иммунная активация, опосредованная ВИЧ-инфекцией, создает постоянный запрос на дифференцировку «покоящихся» Treg в «активированные» Т-лимфоциты, сокращая размер пула клеток-предшественников и увеличивая количество эффекторных лимфоцитов. Однако этого, вероятно, оказывается недостаточно, и уровень активации CD4⁺ Т-клеток ВИЧ-инфицированных больных, принимающих АРТ, остается повышенным.

Следует отметить, что относительное количество регуляторных Т-клеток имеет значение при подавлении активности CD4⁺ Т-лимфоцитов, численность которых сокращается на фоне ВИЧ-инфекции. Однако для контроля над функциями иммунных клеток, число которых значительно превышает размер популяции Treg (CD8⁺ Т-лимфоциты, клетки врожденного иммунитета и т.д.), важным показателем является абсолютное количество регуляторных Т-клеток. В настоящем исследовании было показано, что у ВИЧ-инфицированных больных, принимающих АРТ, дефицит CD4⁺ Т-лимфоцитов не приводит к значительному сокращению абсолютного количества регуляторных Т-клеток. Более того, численность «активированных» Treg, обладающих наибольшей супрессорной активностью, не отличается у ВИЧ-позитивных больных и лиц без ВИЧ-инфекции.

Так как среди обследованных нами пациентов не отмечено клинических признаков аутоиммунных заболеваний, которые проявляются при дефиците и нарушении супрессорной функции Treg [22], можно заключить, что размер пула регуляторных Т-лимфоцитов ВИЧ-позитивных больных, получающих АРТ, является достаточным для контроля иммунного ответа по отношению к аутоантигенам. Вместе с тем даже сравнительно высокая численность этих клеток в крови ВИЧ-инфицированных больных, принимающих терапию, может оказаться недостаточной для полного контроля над развивающимся системным воспалением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У ВИЧ-инфицированных пациентов, которым была своевременно назначена терапия и у которых лечение привело к эффективному подавлению вирусной нагрузки ВИЧ и удовлетворительному приросту числа периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов, поддерживается сравнительно большой пул периферических регуляторных Т-клеток. Однако этих лимфоцитов оказывается недостаточно для полного контроля над иммун-

ной активацией, развивающейся на фоне хронической лентивиральной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Giorgi J.V., Hultin L.E., McKeating J.A., Johnson T.D., Owens B., Jacobson L.P. et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J. Infect. Dis.* 1999; 179 (4): 859–870. DOI: 10.1086/314660. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068581>. <http://jid.oxfordjournals.org/content/179/4/859.full.pdf>.
2. Deeks S.G., Kitchen C.M., Liu L., Guo H., Gascon R., Narvaez A.B. et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T-cell changes independent of viral load. *Blood*. 2004; 104 (4): 942–947. DOI: 10.1182/blood-2003-09-3333. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15117761>.
3. Evans T.G., Bonnez W., Soucier H.R., Fitzgerald T., Gibbons D.C., Reichman R.C. Highly active antiretroviral therapy results in a decrease in CD8(+) T cell activation and preferential reconstitution of the peripheral CD4(+) T cell population with memory rather than naive cells. *Antivir. Res.* 1998; 39 (3): 163–173. DOI: 10.1016/S0166-3542(98)00035-7. <Go to ISI>://WOS:000076934000002.
4. Neuhaus J., Jacobs D.R., Baker J.V., Calmy A., Duprez D., La Rosa A. et al. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J. Infect. Dis.* 2010; 201 (12): 1788–1795. DOI: 10.1086/652749. <Go to ISI>://WOS:000277687900003.
5. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 531–562. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032588>.
6. Zhang W., Sharma R., Ju S., He X., Tao Y., Tsuneyama K. et al. Deficiency in regulatory T cells results in development of antimitochondrial antibodies and autoimmune cholangitis. *Hepatology*. 2009; 49 (2): 545–552. DOI: 10.1002/hep.22651.
7. Moreno-Fernandez M.E., Zapata W., Blackard J.T., Franchini G., Chougnet C.A. Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain. *J. Virol.* 2009; 83 (24): 12925–12933. DOI: 10.1128/JVI.01352-09. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828616>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2786841/pdf/1352-09.pdf>.
8. Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A. et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009; 30 (6): 899–911. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.03.019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19464196>. [https://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613\(09\)00202-7.pdf](https://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613(09)00202-7.pdf).

9. Venken K., Thewissen M., Hellings N., Somers V., Hensen K., Rummens J.L. et al. A CFSE based assay for measuring CD4+CD25+ regulatory T-cell mediated suppression of auto-antigen specific and polyclonal T cell responses. *J. Immunol. Methods*. 2007; 3 22 (1–2): 1–11. DOI: 10.1016/j.jim.2007.01.025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368474>.
10. Ndhlovu L.C., Loo C.P., Spotts G., Nixon D.F., Hecht F.M. FOXP3 expressing CD127lo CD4+ T cells inversely correlate with CD38+ CD8+ T-cell activation levels in primary HIV-1 infection. *J. Leukoc. Biol.* 2008; 83 (2): 254–262. 10.1189/jlb.0507281. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982112>. <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1189/jlb.0507281>.
11. Eggena M.P., Barugahare B., Jones N., Okello M., Mutalya S., Kityo C. et al. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J. Immunol.* 2005; 174 (7): 4407–4414. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778406>. <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/174/7/4407.full.pdf>.
12. Prendergast A., Prado J.G., Kang Y.H., Chen F., Riddell L.A., Luzzi G. et al. HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. *AIDS*. 2010; 24 (4): 491–502. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3283344895. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20071976>.
13. Lim A., Tan D., Price P., Kamarulzaman A., Tan H.Y., James I. et al. Proportions of circulating T cells with a regulatory cell phenotype increase with HIV-associated immune activation and remain high on antiretroviral therapy. *AIDS*. 2007; 21 (12): 1525–1534. DOI: 10.1097/QAD.0b013e32825eab8b. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17630546>.
14. Cao W., Jamieson B.D., Hultin L.E., Hultin P.M., Detels R. Regulatory T cell expansion and immune activation during untreated HIV type 1 infection are associated with disease progression. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2009; 25 (2): 183–191. DOI: 10.1089/aid.2008.0140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19239357>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2782619/pdf/aid.2008.0140.pdf>.
15. Tenorio A.R., Spritzler J., Martinson J., Gichinga C.N., Pollard R.B., Lederman M.M. et al. The effect of aging on T-regulatory cell frequency in HIV infection. *Clin. Immunol.* 2009; 130 (3): 298–303. DOI: 10.1016/j.clim.2008.10.001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008157>.
16. Zhang Z., Jiang Y., Zhang M., Shi W., Liu J., Han X. et al. Relationship of frequency of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells with disease progression in antiretroviral-naïve HIV-1 infected Chinese. *Jpn. J. Infect Dis.* 2008; 61 (5): 391–392. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806350>.
17. Marziali M., de Santis W., Carello R., Leti W., Esposito A., Isgro A. et al. T-cell homeostasis alteration in HIV-1 infected subjects with low CD4 T-cell count despite undetectable virus load during HAART. *AIDS*. 2006; 20 (16): 2033–2041. DOI: 10.1097/01.aids.0000247588.69438.f. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053349>.
18. Weiss L., Piketty C., Assoumou L., Didier C., Caccavelli L., Donkova-Petrini V. et al. Relationship between regulatory T cells and immune activation in human immunodeficiency virus-infected patients interrupting antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2010; 5 (7): e11659. DOI: 10.1371/journal.pone.0011659. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20657770>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2908121/pdf/pone.0011659.pdf>.
19. Chevalier M.F., Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood*. 2013; 121 (1): 29–37. DOI: 10.1182/blood-2012-07-409755. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23043072>. <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/121/1/29.full.pdf>.
20. Mason G.M., Lowe K., Melchioti R., Ellis R., de Rinaldis E., Peakman M. et al. Phenotypic complexity of the human regulatory T-cell compartment revealed by mass cytometry. *J. Immunol.* 2015; 195 (5): 2030–2037. DOI: 10.4049/jimmunol.1500703. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26223658>.
21. Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., Fehervari Z. et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008; 322 (5899): 271–275. DOI: 10.1126/science.1160062. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845758>. <http://science.sciencemag.org/content/322/5899/271.long>.
22. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133 (5): 775–787. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510923>.

Вклад авторов

Черешнев В.А. – проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение рукописи для публикации. Сайдакова Е.В. – анализ и интерпретация данных. Королевская Л.Б. – выполнение экспериментальной части работы. Шмагель Н.Г. – организация сбора биологического материала и подбор клинических групп. Шмагель К.В. – разработка концепции и дизайна исследования.

Authors contribution

Chereshnev V.A. – verification of critical intellectual content and final approval of the manuscript for publication. Saidakova E.V. – data analysis and interpretation. Korolevskaya L.B. – execution of the experimental part of the work. Shmagel N.G. – organization of the collection of biological material and selection of clinical groups. Shmagel K.V. – concept development and research design.

Сведения об авторах

Черешнев Валерий Александрович, д-р мед. наук, академик РАН, гл. науч. сотрудник, ПФИЦ УрО РАН; зав. кафедрой микробиологии и иммунологии, ПГНИУ; гл. науч. сотрудник, ИИФ УрО РАН, президент Российского научного общества иммунологов, г. Екатеринбург. ORCID iD 0000-0003-4329-147X.

Сайдакова Евгения Владимировна, канд. биол. наук, мл. науч. сотрудник, ПФИЦ УрО РАН; доцент, кафедры микробиологии и иммунологии, ПГНИУ, г. Пермь. ORCID iD 0000-0002-4342-5362.

Королевская Лариса Борисовна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь. ORCID iD 0000-0001-9840-7578.

Шмагель Надежда Геннадьевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, ПФИЦ УрО РАН; врач-иммунолог, Центр СПИД, г. Пермь, Россия. ORCID iD 0000-0002-2763-3620.

Шмагель Константин Владимирович, д-р мед. наук, зав. лабораторией, ПФИЦ УрО РАН; профессор, кафедры микробиологии и иммунологии, ПГНИУ, г. Пермь. ORCID iD 0000-0001-6355-6178.

(✉) **Сайдакова Евгения Владимировна**, e-mail: radimira@list.ru.

Authors information

Chereshnev Valery A., DM, Academician of RAS, Chief Researcher, PFRC UB RAS; Head of the Department, PSU, Perm, Russian Federation; Chief Researcher, IIF UB RAS, President of Russian Society for Immunology, Yekaterinburg, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-4329-147X.

Saidakova Evgeniya V., PhD, Junior Researcher, PFRC UB RAS, Perm, Russian Federation; Associate Professor, PSU, Perm, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4342-5362.

Korolevskaya Larisa B., PhD, Researcher, PFRC UB RAS, Perm, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-9840-7578.

Shmagel Nadezhda G., PhD, Senior Researcher, PFRC UB RAS, Perm, Russian Federation; Immunologist, Perm AIDS Center, Perm, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-2763-3620.

Shmagel Konstantin V., DM, Head of the Department, PFRC UB RAS, Perm, Russian Federation; Professor, PSU, Perm, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-6355-6178.

(✉) **Saidakova Evgeniya V.**, e-mail: radimira@list.ru.

Received 18.09.2018

Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 18.09.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Содержание цитокинов и факторов роста во внутриглазной жидкости у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой

Черных В.В.¹, Коненков В.И.², Ермакова О.В.¹, Орлов Н.Б.²,
Обухова О.О.³, Еремина А.В.², Трунов А.Н.^{1,3}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова МЗ РФ», Новосибирский филиал
Россия, 630096, г. Новосибирск, ул. Колхидская, 10

² НИИ клинической и экспериментальной лимфологии (НИИКЭЛ) – филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ «ИЦиГ СО РАН»)
Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

³ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ФИЦ ФТМ СО РАН)
Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучить содержание цитокинов и факторов роста во внутриглазной жидкости пациентов с развитой стадией первичной открытоугольной глаукомы.

Материалы и методы. Были обследованы 56 пациентов с верифицированным на основании офтальмологического обследования диагнозом развитой стадии первичной открытоугольной глаукомы, которые составили основную группу. Контрольную группу составили 30 пациентов с диагнозом «неосложненная катаракта». Концентрацию 17 цитокинов во внутриглазной жидкости и трех изоформ трансформирующего фактора роста (ТФР) β определяли с использованием набора Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay и Bio-Plex Pro™ TGF β 3-plex Assay (Bio-Rad, США) методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном анализаторе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США).

Результаты. Установлено наличие статистически значимо более высоких концентраций цитокинов и факторов роста во внутриглазной жидкости пациентов с развитой стадией первичной открытоугольной глаукомы относительно данных, полученных при исследовании внутриглазной жидкости лиц с неосложненной катарактой (интерлейкины (ИЛ) 6, 7, 8, 12, 17, ТФР β 1, 2, 3, макрофагальный воспалительный протеин (МВП) 1 β), а также статистически значимо более низкие концентрации ИЛ-2, ИЛ-10, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора.

Заключение. В патогенезе первичной открытоугольной глаукомы определяется активность местного хронического воспалительного процесса. Это подтверждается статистически значимыми изменениями изучаемых цитокинов и факторов роста. Установленное нарастание концентраций представителей суперсемейства трансформирующих факторов роста β , обладающих противовоспалительной активностью, способностью стимулировать процессы пролиферации, клеточного роста, синтез белков внеклеточного матрикса и др., свидетельствует об их значимости в механизмах развития первичной открытоугольной глаукомы. Выявленное повышение во внутриглазной жидкости у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой концентраций ИЛ-7, позволяет предположить участие в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы этого аутокринного медиатора активации роста лимфатических структур.

Ключевые слова: первичная открытоугольная глаукома, патогенез, воспаление, цитокины, трансформирующие факторы роста, внутриглазная жидкость.

✉ Трунов Александр Николаевич, e-mail: trunov1963@yandex.ru.

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

Источник финансирования. Исследование проводилось за счет средств государственного задания, тема НИР «Изучение патогенеза открытоугольной глаукомы на основе оценки дисбаланса цитокинов и факторов роста», а также в рамках договоров о научно-практическом сотрудничестве между ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН и ФГБНУ «ФИИ ФТМ» СО РАН.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике Новосибирского филиала НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» МЗ РФ» (протокол № 2 от 02.09.2018).

Для цитирования: Черных В.В., Коненков В.И., Ермакова О.В., Орлов Н.Б., Обухова О.О., Еремина А.В., Трунов А.Н. Содержание цитокинов и факторов роста во внутриглазной жидкости у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 257–265. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-257-265>.

УДК 617.7-007.681-06:617.749:577.112

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-257-265>

Content of cytokines and growth factors in the intraocular fluid of patients with primary open-angle glaucoma

Chernykh V.V.¹, Konenkov V.I.², Ermakova O.V.¹, Orlov N.B.², Obukhova O.O.³, Eremina A.V.², Trunov A.N.^{1,3}

¹ *The Academician S.N. Fyodorov Federal State Institution National Medical Research Center (NMRC) «Intersectoral Research and Technology Complex «Eye microsurgery» Ministry of Health of the Russian Federation», Novosibirsk Branch*

10, Kolkhidskaya Str., Novosibirsk, 630071, Russian Federation

² *Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Federal Research Center of the Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (RICEL – Branch of IC&G SB RAS) 2, Timakova Str., Novosibirsk, 630117, Russian Federation*

³ *Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (FIZ FTM SB RAS) 2, Timakova Str., Novosibirsk, 630117, Russian Federation*

ABSTRACT

Purpose. To study the content of cytokines and growth factors in the intraocular fluid of patients with developed stage of primary open-angle glaucoma (POAG).

Materials and methods. 56 patients with a verified diagnosis developed stage of primary open-angle glaucoma were examined. The control group consisted of 30 patients with a diagnosis of uncomplicated cataract. A concentration of 17 cytokines and 3 isoforms of the transforming growth factor (TGF) β was determined using a Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay and Bio-Plex Pro™ and TGF β 3-plex Assay kit by flow-through fluorometry on a Bio-Plex 200, Bio-Rad double beam laser analyzer, USA.

Results. A statistically significant increase was shown in the concentrations of cytokines and growth factors (interleukins (IL) 6, 7, 8, 12, 17, TGF β 1, 2, 3, macrophage inflammatory protein 1 β) in the intraocular fluid of patients with developed stage of the primary open-angle glaucoma in respect to data obtained from the study of the intraocular fluid of the persons with uncomplicated cataract, as well as a statistically significant decrease in the concentrations IL-2, IL-10, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

Conclusion. In the pathogenesis of primary open-angle glaucoma, the activity of the local chronic inflammatory process is determined. This is confirmed by statistically significant changes in the studied cytokines and growth factors. Increase in the concentrations of the studied representatives of the superfamily

of transforming growth factors-beta, which have anti-inflammatory activity, the ability to stimulate proliferation, cell growth, synthesis of extracellular matrix proteins, etc., attests to their importance in the mechanisms of primary open-angle glaucoma development. Increase concentrations of IL-7 in the intraocular fluid of patients with primary open-angle glaucoma allows us to assume participation in the pathogenesis of the primary open-angle glaucoma of this autocrine mediator of activation of the growth of lymphatic structures.

Key words: primary open-angle glaucoma, pathogenesis, inflammation, cytokines, transforming growth factors, intraocular fluid.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out at the expense of the state assignment, the research topic was “Studying the pathogenesis of the open-angle glaucoma based on the assessment of cytokine imbalance and growth factors”, as well as in the framework of agreements on scientific and practical cooperation between “The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution” of the Ministry of Health of Russia and the branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (IC&G SB RAS) and Federal State Scientific Institution.

Compliance with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Academician S.N. Fyodorov Federal State Institution NMRC «Intersectoral Research and Technology Complex «Eye microsurgery» Ministry of Health of the Russian Federation», Novosibirsk Branch (Protocol No. 2 of 02.09.2018).

For citation: Chernykh V.V., Konenkov V.I., Ermakova O.V., Orlov N.B., Obukhova O.O., Eremina A.V., Trunov A.N. Content of cytokines and growth factors in the intraocular fluid of patients with primary open-angle glaucoma. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 257–265. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-257-265>.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время многими исследователями делается заключение о поступательном увеличении во многих странах мира количества пациентов, страдающих первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ). По мнению авторов научных публикаций, не вызывает сомнения, что ПОУГ является значимой медико-социальной и экономической проблемой современного общества, поскольку приводит к развитию слабости зрения и слепоты [1–5].

Анализ многочисленных исследований, посвященных изучению различных аспектов патогенеза ПОУГ, позволяет сделать заключение, что одним из значимых его аспектов являются морфоструктурные изменения в дренажной системе глаза, которые приводят к усилению сопротивления оттоку внутриглазной жидкости и, как следствие, к повышению внутриглазного давления, которое ведет к экскавации решетчатой пластинки склеры и гибели аксонов ганглиозных клеток зрительного нерва. Указанное находит подтверждение в морфологических исследованиях тканей глаза, в которых было установлено, что при ПОУГ в трабекулярном аппарате выявляются дезорганизация коллагеновых и эластических волокон,

деструкция и дезорганизация соединительной ткани, фибриноидное набухание, пролиферация эндотелиальных клеток, облитерация шлеммова и коллекторных каналов и др. [6–12].

Данные научных исследований о морфоструктурных изменениях в органе зрения, на наш взгляд, позволяют сделать вывод о значимой роли в механизмах развития ПОУГ деструктивно-воспалительного процесса, участниками которого являются цитокины и другие биологически активные медиаторы межклеточных взаимоотношений. В научных исследованиях последних лет было установлено, что в механизмах развития ПОУГ выявлены признаки нарушения продукции различных биологически активных субстанций, и делаются предположения об их влиянии на развитие процессов нейродегенерации, повреждения трабекулы и др. Однако данные этих исследований вызывают споры в научном сообществе и не позволяют сделать однозначные заключения об их значимости в патогенезе ПОУГ [13–19]. Также необходимо отметить, что исследования, посвященные изучению содержания и баланса различных классов цитокинов и факторов роста во внутриглазной жидкости при ПОУГ, достаточно малочисленны, а результаты не всегда находят

подтверждение в других публикациях и являются предметом научной дискуссии [20–24].

Таким образом, изложенные выше данные позволяют сделать заключение об актуальности комплексного изучения содержания и баланса цитокинов и факторов роста во внутриглазной жидкости при первичной открытоугольной глаукоме для понимания молекулярных механизмов развития ПОУГ и сформулировать цель настоящего исследования.

Цель исследования – изучить содержание цитокинов и факторов роста во внутриглазной жидкости пациентов с развитой стадией первичной открытоугольной глаукомы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для решения поставленной задачи были обследованы 56 пациентов (мужчин – 21 (37,5%), женщин – 35 (62,5%); средний возраст $(62,8 \pm 4,3)$ года) с верифицированным на основании офтальмологического обследования диагнозом развитой стадии ПОУГ. Всем пациентам диагноз ставился на основании стандартного офтальмологического обследования, включающего определение остроты зрения, бинокулярную офтальмоскопию, сферопериметрию, эхоофтальмографию, оптическую когерентную томографию, измерение внутриглазного давления. В качестве контрольных значений определяемых в настоящем исследовании цитокинов во внутриглазной жидкости были использованы данные, полученные при исследовании внутриглазной жидкости, взятой до и при хирургическом лечении 30 пациентов (мужчин – 11 (36,7%), женщин – 19 (63,3%); средний возраст $(64,1 \pm 5,7)$ года) с диагнозом «неосложненная катаракта», составивших группу сравнения. Таким образом, по возрастному признаку и гендерному составу обследованные группы не различались.

Критериями исключения являлись: острые и обострения хронических воспалительных заболеваний органа зрения, наличие диабетической ретинопатии, неоваскулярной глаукомы, увеита различной этиологии и локализации, гемофтальма, аутоиммунных и опухолевых процессов любой локализации. Из исследования исключались пациенты, принимавшие для нормализации внутриглазного давления препараты, содержащие аналоги простагландинов, способные активировать воспалительный процесс. У всех пациентов на начальных этапах проведения операции были взяты образцы внутриглазной жидкости (ВГЖ) (75–150 мкл), которые были заморожены и хранились при -70°C до проведения исследования.

Однократно замороженная ВГЖ размораживалась перед исследованием до комнатной температуры. Для удаления осадка проводили ее центрифугирование при 4°C , 10 000 об./мин, 10 мин. Концентрацию 17 цитокинов определяли с использованием набора Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay (Bio-Rad, США) методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном анализаторе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США). Концентрацию изоформ трансформирующего фактора роста (ТФР) β определяли с использованием набора Bio-Plex Pro™ TGF β 3-plex Assay методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном анализаторе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США).

Для обработки данных применялось программное обеспечение Bio-Plex manager Software version 4.1. Концентрация цитокинов выражалась в пг/мл. Анализ данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Использование критерия Колмогорова – Смирнова и Лиллиефорса для нормальности позволило установить отсутствие нормальности распределения в полученных выборках. В связи с этим в исследовании были использованы методы непараметрической статистики. Значимость различий вариационных рядов в несвязанных выборках оценивали с помощью *U*-критерия Манна – Уитни. Данные представлены в виде медианы, нижнего (25%) и верхнего (75%) квартилей $Me [Q_1-Q_3]$. Статистически значимыми различиями считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования были получены данные, представленные в таблице.

Было установлено отсутствие в ВГЖ пациентов обследованных групп фактора некроза опухоли (ФНО) α , интерлейкина (ИЛ) 5, ИЛ-13, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и интерферона (ИФН) γ . Кроме того, не выявлено статистически значимых различий между обследованными группами по содержанию основного провоспалительного цитокина ИЛ-1 β ($p = 0,441$) и моноцитарного хемотаксического фактора 1 ($p = 0,612$). Таким образом, полученные данные по содержанию ФНО α и ИЛ-1 β в ВГЖ можно рассматривать как факт отсутствия активной фазы местного воспаления у пациентов с развитой стадией ПОУГ. В то же время в работе N. Khalef (2017) установлено повышение уровней содержания ФНО α [22], а в публикации S. Ohira (2015), T. Kokubun (2017) определялось нарастание концентрации моноцитарного хемотаксического фактора 1 при ПОУГ [20, 24].

Содержание цитокинов и факторов роста во внутриглазной жидкости пациентов с ПОУГ и неосложненной катарактой, пг/мл, $Me [Q_1-Q_3]$
The content of cytokines and growth factors in the intraocular fluid of patients with POAG and uncomplicated cataract, pg/ml, $Me [Q_1-Q_3]$

Показатель	Пациенты с ПОУГ Patients with POAG	Пациенты с неосложненной катарактой Patients with uncomplicated cataracts	p
ИЛ-1 β /IL-1 β	0,00 [0,00; 0,25]	0,00 [0,00; 0,00]	>0,05
ИЛ-2/IL-2	2,14 [1,09; 3,22]*	4,03 [3,22; 5,79]	<0,05
ИЛ-4/IL-4	0,47 [0,42; 0,83]*	0,88 [0,42; 1,20]	<0,05
ИЛ-6/IL-6	3,46 [2,31; 9,86]*	2,88 [1,74; 4,04]	<0,05
ИЛ-7/IL-7	2,69 [1,27; 4,00]*	0,44 [0,00; 1,27]	<0,05
ИЛ-8/IL-8	1,61 [0,37; 5,04]*	0,37 [0,00; 1,30]	<0,05
ИЛ-10/IL-10	3,77 [3,40; 4,14]*	4,52 [4,14; 4,90]	<0,05
ИЛ-12/IL-12	2,83 [2,13; 4,29]*	2,13 [1,79; 2,13]	<0,05
ИЛ-17/IL-17	8,11 [5,35; 11,44]*	5,53 [2,62; 9,22]	<0,05
Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор/ Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	226,90 [161,42; 278,04]*	381,70 [328,22; 412,63]	<0,05
Моноцитарный хемотаксический фактор-1/ Monocytic chemotactic factor-1	354,14 [279,27; 444,21]	318,94 [269,08; 395,96]	>0,05
МВП-1 β /MIP-1 β	16,06 [8,82; 27,05]*	8,82 [6,98; 23,09]	<0,05
ТФР-1 β /TGF-1 β	210,46 [99,78; 407,28]	93,13 [40,69; 143,19]	<0,05
ТФР-2 β /TGF-2 β	3129,21 [2551,14; 3871,87]*	1981,37 [1706,05; 2283,61]	<0,05
ТФР-3 β /TGF-3 β	11,46 [2,61; 43,84] *	0,00 [0,00; 5,89]	<0,05
Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор/ Granulocyte colony-stimulating factor	—	—	—
Интерферон γ /Interferon γ	—	—	—
Фактор некроза опухоли α / Tumor necrosis factor α	—	—	—
ИЛ-5/IL-5	—	—	—
ИЛ-13/IL-13	—	—	—

* статистически значимые различия с группой пациентов с неосложненной катарактой.

* statistically significant differences with a group of patients with uncomplicated cataracts.

В настоящем исследовании в ВГЖ пациентов с ПОУГ относительно данных, полученных в группе пациентов с неосложненной катарактой, установлено наличие статистически значимо более высоких концентраций ряда цитокинов, обладающих провоспалительными свойствами. Выявлены статистически значимо более высокие ($p < 0,05$) концентрации ИЛ-6, провоспалительного полипотентного цитокина, участвующего в процессах хронизации воспаления, аутоиммунного реагирования и способного регулировать синтез ряда провоспалительных цитокинов, роль которого в механизмах развития офтальмологических заболеваний активно дискутируется [25].

Также в ВГЖ пациентов с ПОУГ определялись статистически значимо более высокие кон-

центрации ($p < 0,01$) ИЛ-8, являющегося по своим свойствам хемоаттрактантом, высокие концентрации которого приводят к активации миграции клеток иммунной системы в очаги повреждения при развитии воспалительного процесса, и ИЛ-17 ($p < 0,05$), способного активировать синтез цитокинов, обладающих провоспалительными свойствами, молекул клеточной и межклеточной адгезии и др. Полученные данные в целом совпадают с данными немногочисленных исследований и могут рассматриваться в контексте значимости развития местного воспалительного процесса у пациентов с ПОУГ [20–22, 24].

Также к фактам, подтверждающим развитие местного воспалительного процесса при ПОУГ, относится наличие статистически значимо более

высоких концентраций цитокинов, обладающих провоспалительными свойствами, – МВП-1 β , участвующего совместно с ИЛ-8 в инициации и развитии воспалительного процесса ($p < 0,05$) и ИЛ-12 ($p < 0,05$). Полученные в настоящем исследовании данные сопоставимы с результатами, представленными в научной литературе [20], авторы которого связывают нарастание концентраций МВП-1 β с высоким уровнем внутриглазного давления. Однако необходимо отметить, что в более ранних работах исследователями показано, что при ПОУГ в ВГЖ тестируется повышение концентраций только ИЛ-6 [26].

При оценке содержания цитокинов, повышение которых связано с активацией иммунного реагирования по Т2-опосредованному пути, установлено наличие статистически значимо более высоких концентраций ИЛ-4 в ВГЖ пациентов с катарактой ($p < 0,05$). Анализируя данные, представленные в научной литературе, посвященной изучению цитокинов у пациентов с ПОУГ в ВГЖ, нам не удалось выявить сопоставимых результатов или описания изменений содержания этого цитокина. В связи с этим представляется логичным связывать выявленные изменения его содержания со способностью участвовать в процессах фиброобразования [27], характерными и для патогенеза ПОУГ [6, 7]. При оценке содержания в ВГЖ ИЛ-10 – цитокина, обладающего противовоспалительными и иммуносупрессорными свойствами, выявлено наличие статистически значимо более низкое его содержание в ВГЖ пациентов с ПОУГ ($p < 0,05$), что, вероятно, может быть связано с развитием в динамике местного воспалительного процесса дисбаланса цитокинов Т-хелпер 1 и Т-хелпера 2, описанного в литературе [28]. В результате проведенного исследования нами было также выявлено наличие статистически значимо более низких концентраций в ВГЖ пациентов с ПОУГ ИЛ-2 ($p < 0,05$) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора ($p < 0,05$), однако их роль в патогенезе ПОУГ остается непонятной и требует углубленного изучения с учетом свойств этих цитокинов.

С нашей точки зрения, несомненный интерес с учетом данных научной литературы последних лет о наличии в структурах глаза элементов лимфатической системы и ее возможной роли в патогенезе ПОУГ [29–31] представляет установленная статистически значимая более высокая концентрация ИЛ-7 в ВГЖ у пациентов с ПОУГ ($p < 0,05$), цитокина, способного быть потенциальным аутокринным медиатором лимфатического дренажа [32].

Важным для понимания патогенеза ПОУГ является наличие в ВГЖ статистически значимо более высоких концентраций трех представителей суперсемейства ТФР β (ТФР-1 β , $p < 0,05$; ТФР-2 β , $p < 0,05$; ТФР-3 β , $p < 0,05$), цитокинов, обладающих противовоспалительной активностью, способностью активировать процессы пролиферации, клеточного роста, синтеза белков внеклеточного матрикса и др. [33, 34].

Выявленные изменения содержания представителей суперсемейства ТФР β в ВГЖ при ПОУГ можно рассматривать как направленное на компенсацию последствий развития воспалительного процесса. Однако мы склонны рассматривать нарастание их концентраций как негативный фактор, реализация которого может инициировать усиленный синтез белков внеклеточного матрикса, ремоделирование поврежденной трабекулярной сети, что приведет к увеличению сопротивления оттоку ВГЖ и повышению внутриглазного давления. Сходной позиции придерживаются авторы ряда научных публикаций [35, 36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило установить, что в ВГЖ пациентов с ПОУГ выявляются статистически значимо более высокие концентрации цитокинов, обладающих провоспалительной активностью (ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-17, МВП-1 β), что свидетельствует о значимости в патогенезе ПОУГ местного хронического воспалительного процесса. Установлено, что в ВГЖ пациентов с ПОУГ определяются статистически значимо более высокие концентрации представителей суперсемейства ТФР β (ТФР-1 β , ТФР-2 β , ТФР-3 β), обладающих противовоспалительной активностью, действие которых направлено на компенсацию последствий развития воспалительного процесса, но способно привести к ремоделированию поврежденной трабекулярной сети с увеличением сопротивления оттоку ВГЖ и повышению внутриглазного давления. Выявленные высокие концентрации ИЛ-7 в ВГЖ пациентов с ПОУГ позволяют предположить участие этого аутокринного медиатора активации роста лимфатических структур в патогенезе.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kymes S.M., Plotzke M.R., Li J.Z., Nichol M.B., Wu J., Fain J. The increased cost of medical services for people diagnosed with primary open-angle glaucoma: a decision analytic approach. *Am. J. Ophthalmol.* 2010; 150 (1): 74–81. DOI: 10.1167/iov.09-5147.

2. Егоров Е.А., Куроедов А.В. Отдельные клинико-эпидемиологические характеристики глаукомы в странах СНГ и Грузии. Результаты многоцентрового открытого ретроспективного исследования (ч. 1) *РМЖ. Клиническая офтальмология*. 2011; (3): 97–100. [Egorov E.A., Kuroyedov A.V. Separate clinical and epidemiological characteristics of glaucoma in the CIS and Georgia. Results of a multicentre open retrospective study (Part 1). *RMJ. Clinical ophthalmology*. 2011; (3): 97–100 (in Russ.)].
3. Stevens G.A., White R.A., Flaxman S.R., Price H., Jonas J.B., Keeffe J., Leasher J., Naidoo K., Pesudovs K., Resnikoff S., Taylor H., Bourne R.R. Vision Loss Expert Group. Global prevalence of visual impairment and blindness: magnitude and temporal trends, 1990–2010. *Ophthalmology*. 2013; 120 (12): 2377–2384. DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.05.025.
4. Tham Y.C., Li X., Wong T.Y., Quigley H.A., Aung T., Cheng C.Y. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2014; 121: 2081–2090. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.05.013.
5. Muratov S., Podbielski D.W., Jack S.M. Preference-based disease-specific health-related quality of life instrument for glaucoma: a mixed methods study protocol. *BMJ Open*. 2016; 6 (11): e012732. DOI: 10.1136/bmjopen-2016-012732.
6. Junglas B., Kuespert S., Seleem A.A., Struller T., Ullmann S., Bösl M., Bosserhoff A., Köstler J., Wagner R., Tamm E.R., Fuchshofer R. Connective tissue growth factor causes glaucoma by modifying the actin cytoskeleton of the trabecular meshwork. *Am. J. Pathol.* 2012; 180 (6): 2386–2403. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.02.030.
7. Sihota R., Goyal A., Kaur J., Gupta V., Nag T.C. Scanning electron microscopy of the trabecular meshwork: understanding the pathogenesis of primary angle closure glaucoma. *Indian J. Ophthalmol.* 2012; 60 (3): 183–188. DOI: 10.4103/0301-4738.95868.
8. Еричев В.П., Егоров Е.А. Патогенез первичной открытоугольной глаукомы *Вестник офтальмологии*. 2014; 130 (6): 98–105. [Erichiev V.P., Egorov E.A. Pathogenesis of primary open-angle glaucoma *Vestnik ophthalmology*. 2014; 130 (6): 98–105 (in Russ.)].
9. Huang A.S., Mohindroo C., Weinreb R.N. Aqueous Humor Outflow Structure and Function Imaging. At the Bench and Bedside: A Review. *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2016; 7 (4): 578. DOI: 10.4172/2155-9570.1000578.
10. Carreon T., van der Merwe E., Fellman R.L., Johnstone M., Bhattacharya S.K. Aqueous outflow – A continuum from trabecular meshwork to episcleral veins. *Prog. Retin. Eye Res.* 2017; 57: 108–133. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.12.004.
11. Song M.M., Lei Y., Wu J.H., Sun X.H. The progress of studies on aqueous humor dynamics abnormality induced by trabecular meshwork and Schlemm canal endothelial cell senescence and its relation with glaucoma. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2017; 53 (11): 868–873. DOI: 10.3760/cm.a.j.issn.0412-4081.2017.11.014.
12. Wang K., Read A.T., Sulchek T., Ethier C.R. Trabecular meshwork stiffness in glaucoma. *Exp. Eye Res.* 2017; 158: 3–12. DOI: 10.1016/j.exer.2016.07.011.
13. Huang P., Zhang S.S., Zhang C. Erratum: The two sides of cytokine signaling and glaucomatous optic neuropathy. *J. Ocul. Biol. Dis. Infor.* 2009; 2 (3): 98–103. DOI: 10.1007/s12177-009-9026-6.
14. Xu S.L., Gao Z.Z., Wang Y., Chen J. Expression of matrix metalloproteinases and inhibitors on the scleral tissue of lamina cribrosa in rat with experimental chronic ocular hypertension. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2009; 45 (3): 260–265. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2009.03.015.
15. Yu A.L., Birke K., Moriniere J., Welge-Lüssen U. TGF-beta 2 induces senescence-associated changes in human trabecular meshwork cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51 (11): 5718–5723. DOI: 10.1167/iovs.10-5679.
16. Taurone S., Ripandelli G., Pacella E., Bianchi E., Plateroti A.M., De Vito S., Plateroti P., Grippaudo F.R., Cavallotti C., Artico M. Potential regulatory molecules in the human trabecular meshwork of patients with glaucoma: immunohistochemical profile of a number of inflammatory cytokines. *Mol. Med. Rep.* 2015; 11 (2): 1384–1390. DOI: 10.3892/mmr.2014.2772.
17. Трунов А.Н., Бгатова Н.П., Еремина А.В., Дружинин И.Б., Пожидаева А.А., Трунова Л.А., Черных В.В. Новые подходы к оценке выраженности воспалительных нарушений в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы. *Аллергология и иммунология*. 2016; 17 (2): 107–111. [Trunov A.N., Bgatova N.P., Eremina A.V., Druzhinin I.B., Pozhidaeva A.A., Trunova L.A., Chernykh V.V. New approaches to assessing the severity of inflammatory disorders in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Allergology and Immunology*. 2016; 17 (2): 107–111 (in Russ.)].
18. Lee N.Y., Park H.Y., Park C.K., Ahn M.D. Analysis of systemic endothelin-1, matrix metallo-proteinase-9, macrophage chemoattractant protein-1, and high-sensitivity C-reactive protein in normal tension glaucoma. *Current Eye Research*. 2012; 37 (12): 1121–1126.
19. Zhang Y., Yang Q., Guo F., Chen X., Xie L. Link between neurodegeneration and trabecular meshwork injury in glaucomatous patients. *BMC Ophthalmol.* 2017; 17 (1): 223. DOI: 10.1186/s12886-017-0623-z.
20. Kokubun T., Tsuda S., Kunikata H., Yasuda M., Himori N., Kunimatsu-Sanuki S., Maruyama K., Nakazawa T. Characteristic profiles of inflammatory cytokines in the aqueous humor of glaucomatous eyes. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2017; 16: 1–12. DOI: 10.1080/09273948.2017.1327605.
21. Tong Y., Zhou Y.L., Zheng Y., Biswal M., Zhao P.Q., Wang Z.Y. Analyzing cytokines as biomarkers to evaluate severity of glaucoma. *Int. J. Ophthalmol.* 2017; 10 (6): 925–930. DOI: 10.18240/ijo.2017.06.15.
22. Khalef N., Labib H., Helmy H., El Hamid M.A., Moemen L., Fahmy I. Levels of cytokines in the aqueous humor of eyes with primary open angle glaucoma, pseudoexfolia-

- tion glaucoma and cataract. *Electron Physician*. 2017; 9 (2): 3833–3837. DOI: 10.19082/3833.
23. Черных В.В., Бгатова Н.П., Орлов Н.Б., Ермакова О.В., Трунов А.Н. Местный воспалительный процесс при глаукоме как возможное проявление нарушений увеолимфатического оттока внутриглазной жидкости при глаукоме (ч.2). *Национальный журнал глаукома*. 2018; 17 (2): 3–11. [Chernykh V.V., Bgatova N.P., Orlov N.B., Ermakova O.V., Trunov A.N. Local inflammatory process as a possible manifestation of intraocular fluid uveolymphatic outflow defects in glaucoma. Part 2. *National Journal of Glaucoma*. 2018; 17 (2): 3–11 (in Russ.)]. DOI: 10.25700/NJG.2018.02.01.
 24. Ohira S., Inoue T., Shobayashi K., Iwao K., Fukushima M., Tanihara H. Simultaneous increase in multiple proinflammatory cytokines in the aqueous humor in neovascular glaucoma with and without intravitreal bevacizumab injection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2015; 56 (6): 3541–3548. DOI: 10.1167/iovs.14-15918.
 25. Zahir-Jouzani F., Atyabi F., Mojtavani N. Interleukin-6 participation in pathology of ocular diseases. *Pathophysiology*. 2017; 24 (3): 123–131. DOI: 10.1016/j.pathophys.2017.05.005.
 26. Engel L.A., Muether P.S., Fauser S., Hueber A. The effect of previous surgery and topical eye drops for primary open-angle glaucoma on cytokine expression in aqueous humor. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*. 2014; 252 (5): 791–799. DOI: 10.1007/s00417-014-2607-5.
 27. Peng H., Sarwar Z., Yang X.P., Peterson E.L., Xu J., Janic B., Rhaleb N., Carretero O.A., Rhaleb N.E. Pro-fibrotic role for interleukin-4 in cardiac remodeling and dysfunction. *Hypertension*. 2015; 66 (3): 582–589. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05627.
 28. Wong M., Huang P., Li W., Li Y., Zhang S.S., Zhang C. T-helper1/T-helper2 cytokine imbalance in the iris of patients with glaucoma. *PLoS One*. 2015; 10 (3): e0122184. DOI: 10.1371/journal.pone.0122184.
 29. Черных В.В., Дружинин И.Б., Еремина А.В., Ходжаев Н.С., Коненков В.И., Бородин Ю.И., Бгатова Н.П., Пожидаева А.А., Трунов А.Н. Роль лимфатической системы в увеосклеральном оттоке внутриглазной жидкости. *Офтальмохирургия*. 2015; (2): 74–79. [Chernykh V.V., Druzhinin I.B., Eremina A.V., Khodzhaev N.S., Konenkov V.I., Borodin Yu.I., Bgatova N.P., Pozhidaeva A.A., Trunov A.N. The role of the lymphatic system in the uveoscleral outflow of the intraocular fluid. *Ophthalmic Surgery*. 2015; (2): 74–79 (in Russ.)].
 30. Kim M., Johnston M.G., Gupta N., Moore S., Yücel Y.H. A model to measure lymphatic drainage from the eye. *Exp. Eye Res*. 2011; 93 (5): 586–591. DOI: 10.1016/j.exer.2011.07.006.
 31. Schroedl F., Kaser-Eichberger A., Schlereth S.L., Bock F., Regenfuss B., Reitsamer H.A., Lütty G.A., Maruyama K., Chen L., Lütjen-Drecoll E., Dana R., Kerjaschki D., Alitalo K., De Stefano M.E., Junghans B.M., Heindl L.M., Cursiefen C. Consensus Statement on the Immunohistochemical Detection of Ocular Lymphatic Vessels. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2014; 55 (10): 6440–6442. DOI: 10.1167/iovs.14-15638.
 32. Iolyeva M., Aebischer D., Proulx S.T., Willrodt A.H., Ecoiffier T., Häner S., Bouchaud G., Krieg C., Onder L., Ludewig B., Santambrogio L., Boyman O., Chen L., Finke D., Halin C. Interleukin-7 is produced by afferent lymphatic vessels and supports lymphatic drainage. *Blood*. 2013; 122 (13): 2271–2281. DOI: 10.1182/blood-2013-01-478073.
 33. Ikushima H., Miyazono K. Biology of transforming growth factor- β signaling. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2011; 12 (12): 2099–2107. DOI: 10.2174/138920111798808419.
 34. Poniatowski Ł., Wojdasiewicz P., Gasik R., Szukiewicz D. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm*. 2015; 137823. DOI: 10.1155/2015/137823.
 35. Wordinger R.J., Sharma T., Clark A.F. The role of TGF- β 2 and bone morphogenetic proteins in the trabecular meshwork and glaucoma. *J. Ocul. Pharmacol. Ther*. 2014; 30 (2–3): 154–162. DOI: 10.1089/jop.2013.0220.
 36. Murphy-Ullrich J.E., Downs J.C. The Thrombospondin1-TGF- β Pathway and Glaucoma. *J. Ocul. Pharmacol. Ther*. 2015; 31 (7): 371–375. DOI: 10.1089/jop.2015.0016.

Вклад авторов

Черных В.В. – разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, написание текста статьи. Коненков В.И. – разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания. Ермакова О.В. – подбор и офтальмологическое обследование пациентов, проведение оперативного лечения и забор биоматериала для исследования, анализ и интерпретация данных. Орлов Н.Б. – проведение определения цитокинов во внутриглазной жидкости, статистическая обработка данных.

Authors contribution

Chernykh V.V. – development of concept and design, verification of critical intellectual content, writing the text of the article. Konenkov V.I. – concept and design development, testing of critical intellectual content. Ermakova O.V. – selection and ophthalmologic examination of patients, surgical treatment and collection of biomaterial for research, analysis and interpretation of data. Orlov N.B. – determination of cytokines in the intraocular fluid, statistical data processing. Obukhova O.O. – data analysis and interpretation, statistical data processing. Eremina A.V. – ophthalmologic examination

Еремина А.В. – офтальмологическое обследование пациентов, анализ и интерпретация данных. Обухова О.О. – анализ и интерпретация данных, статистическая обработка данных. Трунов А.Н. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, написание текста статьи.

Сведения об авторах

Черных Валерий Вячеславович, д-р мед. наук, профессор, директор Новосибирского филиала НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» МЗ РФ», г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-7623-3359.

Коненков Владимир Иосифович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. лабораторией клинической иммуногенетики, НИИКЭЛ – филиал ФИЦ «ИЦиГ СО РАН», г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0001-7385-6270.

Ермакова Ольга Викторовна, врач-офтальмолог, Новосибирский филиал НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» МЗ РФ», г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-0427-1564.

Орлов Николай Борисович, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория иммуногенетики, НИИКЭЛ – филиал ФИЦ «ИЦиГ СО РАН», г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-3437-7151.

Обухова Ольга Олеговна, д-р мед. наук, руководитель лаборатории иммунологии, ФИЦ ФТМ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-9834-1799.

Еремина Алена Викторовна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, Новосибирский филиал НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» МЗ РФ», г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-6913-0925.

Трунов Александр Николаевич, д-р мед. наук, профессор, зам. директора по научной работе Новосибирского филиала ФМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» МЗ РФ»; гл. науч. сотрудник, лаборатория иммунологии, ФИЦ ФТМ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-7592-8984.

(✉) **Трунов Александр Николаевич**, e-mail: trunov1963@yandex.ru.

Поступила в редакцию 10.10.2018

Подписана в печать 17.12.2018

of patients, data analysis and interpretation. Trunov A.N. – substantiation of the manuscript, verification of critical intellectual content, writing the text of the article.

Authors information

Chernykh Valeriy V., DM, Professor, Director of Novosibirsk Branch of the Academician S.N. Fyodorov Federal State Institution NMRC «Intersectoral Research and Technology Complex «Eye microsurgery» Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7623-3359.

Konenkov Vladimir I., DM, Professor, Academician of RAS, Head of the Laboratory of Clinical Immunogenetics, RICEL – Branch of IC&G SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-7385-6270.

Orlov Nikolai B., DM, Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunogenetics, RICEL – Branch of IC&G SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-3437-7151.

Ermakova Olga V., Ophthalmologist, Novosibirsk Branch of the Academician S.N. Fyodorov Federal State Institution NMRC «Intersectoral Research and Technology Complex «Eye microsurgery» Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0427-1564.

Obukhova Olga O., DM, Head of the Laboratory of Immunology, FIZ FTM SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9834-1799.

Eremina Alena V., PhD, Researcher, Novosibirsk Branch of the Academician S.N. Fyodorov Federal State Institution NMRC «Intersectoral Research and Technology Complex «Eye microsurgery» Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-6913-0925.

Trunov Aleksandr N., DM, Professor, Deputy Director for Science, Novosibirsk Branch of the Academician S.N. Fyodorov Federal State Institution NMRC «Intersectoral Research and Technology Complex «Eye microsurgery» Ministry of Health of the Russian Federation; Chief Researcher, Laboratory of Immunology, FIZ FTM SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7592-8984.

(✉) **Trunov Aleksandr N.**, e-mail: trunov1963@yandex.ru.

Received 10.10.2018

Accepted 17.12.2018

Фенотип и функции дендритных клеток человека, генерированных из субпопуляций моноцитов CD14⁺, оппозитных по экспрессии CD16

Черных Е.Р., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А.,
Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Сахно Л.В., Останин А.А.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
Россия, 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Анализ взаимосвязи между субпопуляционной принадлежностью моноцитов и фенотипом и (или) функциями генерируемых дендритных клеток (dendrite cells, DC), а также их чувствительностью к толерогенному действию дексаметазона.

Материалы и методы. В исследование включены 15 здоровых доноров. DC генерировали с интерфероном альфа (IFN α) и колониестимулирующим фактором гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) из обогащенной популяции CD14⁺ моноцитов периферической крови с деплецией (CD16⁻Mo-DC) и без деплеции (CD16⁺Mo-DC) CD16⁺ клеток. Субпопуляции моноцитов получали методом магнитной сепарации.

Результаты. CD16⁺Mo-DC характеризовались большим содержанием зрелых DC (CD83⁺CD14⁻) и меньшим количеством клеток промежуточной степени зрелости (CD14⁺CD83⁺), но были сопоставимы с CD16⁻Mo-DC по экспрессии HLA-DR и CD86, участвующих в презентации антигенов и активации наивных Т-клеток, а также ингибиторных (толерогенных) молекул B7-H1 и TLR-2. При этом CD16⁺-Mo-DC проявляли более высокую аллостимуляторную активность, которая прямо коррелировала с экспрессией CD86 ($r_s = 0,69$) и обратно – с экспрессией TLR-2 ($r_s = -0,72$). Аллостимуляторная активность CD16⁻Mo-DC находилась в прямой взаимосвязи с количеством зрелых CD14⁺CD83⁺DC и CD14⁺CD83⁺DC промежуточной степени зрелости. Добавление дексаметазона (10^{-6} М) в культуры CD16⁻Mo-DC и CD16⁺Mo-DC сопровождалось задержкой созревания DC, снижением экспрессии CD86 и повышением TLR-2, а также увеличением количества клеток с ингибиторным фенотипом CD86⁻B7-H1⁺, что, в свою очередь, ассоциировалось со снижением аллостимуляторной активности DC. Снижение индекса соотношения CD86⁺/TLR-2⁺ клеток в популяции CD16⁺Mo-DC в большей степени обусловлено уменьшением количества CD86⁺DC, а в популяции CD16⁻Mo-DC – возрастанием числа клеток TLR-2⁺. При этом ингибирующий эффект дексаметазона на созревание DC был более выраженным в популяции CD16⁺Mo-DC.

Заключение. CD14⁺ моноциты, как содержащие, так и истощенные по CD16⁺клеткам, дифференцируются в присутствии IFN α в DC, однако наличие в общем пуле моноцитарных предшественников CD16⁺ клеток ассоциируется с генерацией DC с более зрелым фенотипом и высокой аллостимуляторной активностью. DC, генерированные из субпопуляций моноцитов, оппозитных по экспрессии CD16, характеризуются чувствительностью к супрессорному эффекту дексаметазона. При этом толерогенная активность дексаметазона в субпопуляциях CD16⁻Mo-DC и CD16⁺Mo-DC опосредуется с вовлечением различных механизмов.

Ключевые слова: дендритные клетки, интерферон альфа, аллостимуляторная активность, дексаметазон.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00215-А.

Соответствие принципам этики. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии (протокол № 104 от 12.01.2018).

Для цитирования: Черных Е.Р., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Сахно Л.В., Останин А.А. Фенотип и функции дендритных клеток человека, генерированных из субпопуляций моноцитов CD14⁺, оппозитных по экспрессии CD16. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 266–276. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-266-276>.

УДК 612.017:611.018.83:577.27

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-266-276>

Phenotype and functions of human dendritic cells derived from CD14⁺ monocyte subsets opposed to CD16 expression

Chernykh E.R., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Kurochkina Yu. D., Oleynik E.A., Sakhno L.V., Ostanin A.A.

Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI) 14, Yadrintsevsкая Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to analyze the relationship between monocyte subpopulations and phenotype/functions of monocyte-derived dendritic cells (DCs), as well as DC sensitivity to the tolerogenic effect of dexamethasone.

Materials and methods. The study included 15 healthy donors. DCs were generated by cultivating enriched fractions of CD14⁺ monocytes with or without CD16⁺ cell depletion (CD16[−]Mo-DCs or CD16⁺Mo-DCs, respectively) in the presence of interferon alpha (IFNα) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Monocyte subpopulations were obtained by immunomagnetic negative selection.

Results. CD16⁺Mo-DCs were characterized by higher percentage of mature (CD83⁺CD14⁺) and lower number of semi-mature (CD14⁺CD83⁺) cells, but were similar to CD16[−]Mo-DCs by HLA-DR and CD86 expression, involved in the presentation of antigens and activation of naive T-cells. and also to co-inhibitory/tolerogenic molecules B7-H1 and TLR-2. CD16⁺Mo-DCs displayed higher allostimulatory activity, which was positively correlated with CD86 expression ($r_s = 0.69$; $p = 0.027$) and negatively – with TLR-2 expression ($r_s = -0.72$; $p = 0.1$). Allostimulatory activity of CD16[−]Mo-DCs was positively correlated with the number of mature CD14⁺CD83⁺DCs and semi-mature CD14⁺CD83⁺DCs. Addition of dexamethasone (10^{−6} M) into CD16[−]Mo-DCs and CD16⁺Mo-DCs cultures led to the delay of DC maturation, the decrease of CD86 and the increase of TLR-2 expression, as well as the increase of cells with co-inhibitory CD86[−]B7-H1⁺ phenotype that was positively correlated with the reduction of DC allostimulatory activity. The decrease of CD86⁺/TLR-2⁺ index in CD16⁺Mo-DC population was due to the reduction of CD86⁺DCs and in CD16[−]Mo-DC population – to the increase of TLR-2⁺ cells. Dexamethasone possessed higher inhibitory effect on DC maturation in the CD16⁺Mo-DC cultures.

Conclusion. CD14⁺ monocytes, both contained and depleted by CD16⁺ cells, can differentiate into DCs when cultured with IFNα. The presence of CD16⁺ cells in whole blood monocyte pool is associated with generation of DCs showed a more mature phenotype and higher allostimulatory activity. Both CD16[−] and CD16⁺ monocyte-derived DCs are sensitive to suppressive effect of dexamethasone. However, dexamethasone tolerogenic effect involves different mechanisms in CD16[−]Mo-DCs and CD16⁺Mo-DCs.

Key words: dendritic cells, interferon-α, allostimulatory activity, dexamethasone.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research as part of the research project No. 18-015-00215-A.

Conformity with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Protocol No. 104 of 12.01.2018).

For citation: Chernykh E.R., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Kurochkina Yu. D., Oley-nik E.A., Sakhno L.V., Ostanin A.A. Phenotype and functions of human dendritic cells derived from CD14⁺ monocyte subsets opposed to CD16 expression. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 266–276. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-266-276>.

ВВЕДЕНИЕ

Циркулирующие моноциты человека представлены гетерогенной популяцией, которая включает классические (CD14⁺CD16⁻), промежуточные (CD14⁺⁺CD16⁺) и неклассические (CD14⁺CD16⁺⁺) моноциты, различающиеся не только фенотипически, но и функционально [1]. Классические моноциты являются доминирующей субпопуляцией, тогда как количество CD16-позитивных клеток не превышает 10–20% [1–4]. Однако при различных патологических состояниях это соотношение может существенно меняться. Поскольку моноциты являются предшественниками дендритных клеток (dendritic cell, DC), нельзя исключить, что изменения в структуре пула циркулирующих моноцитов могут сказываться на процессах дифференцировки, созревания и функциях генерируемых DC.

Дендритные клетки, являясь специализированными антигенпрезентирующими клетками, способны как стимулировать иммунный ответ, так и индуцировать толерантность [5]. Роль различных субпопуляций моноцитов в детерминировании функциональной активности генерируемых из них DC в последние годы активно обсуждается. Тем не менее имеющиеся данные противоречивы [6, 7] и не позволяют однозначно ответить на вопрос, в какой степени функции DC связаны с фенотипом моноцитов-предшественников. Следует также отметить, что исследования такого рода проводятся с использованием DC, генерированных из моноцитов в присутствии интерлейкина (IL) 4 (IL-4-DC) [8]. Между тем альтернативным индуктором дифференцировки моноцитов в DC является интерферон альфа (IFNα) [9]. Замена IL-4 на IFNα позволяет получить IFN-DC с промежуточным типом зрелости, которые отличаются большей стабильностью, более выраженной миграционной, Th1- или провоспалительной и противоопухолевой цитотоксической активно-

стью [10, 11]. Участие клеток отдельных субпопуляций моноцитов в генерации IFN-DC совсем не исследовано. Неясным также остается вопрос, могут ли различные субпопуляции моноцитов детерминировать чувствительность генерируемых DC к толерогенным сигналам.

Одним из ключевых эндогенных медиаторов толерогенной активности DC являются глюкокортикоиды, уровень которых возрастает при любых стресс-реакциях, сопровождающих воспалительный процесс. Проведенные нами ранее исследования показали, что дексаметазон *in vitro* подавляет созревание IFN-DC, усиливает экспрессию толерогенных молекул (TLR-2), снижает цитокин-секреторную и аллостимуляторную активность DC [12]. При этом выраженность толерогенного фенотипа дексаметазон-модифицированных IFN-DC прямо коррелировала с содержанием неклассических клеток CD14⁺CD16⁺⁺ среди моноцитов-предшественников (данные не опубликованы).

Целью настоящей работы явилось изучение взаимосвязи между субпопуляционной принадлежностью моноцитов и фенотипом и (или) функциями генерируемых IFN-DC, а также их чувствительностью к толерогенному действию дексаметазона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 15 здоровых доноров обоего пола в возрасте 20–54 лет. Забор крови и все исследования проводили после получения письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (MNC) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина. Для выделения моноцитов из полученной взвеси MNC использовали наборы магнитных бус (Easy SepTM, STEMCELL Technologies Inc., Кана-

да), позволяющие получить популяции моноцитов CD14⁺ с деплецией (CD14⁺CD16⁻) и без деплеции клеток CD16⁺ (CD14⁺CD16⁺). Магнитную сепарацию осуществляли согласно инструкциям производителя. Контроль чистоты выделенных субпопуляций моноцитов проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием

FITC-конъюгированных анти-CD14- и Ре-конъюгированных анти-CD16-антител (BD PharMingen, США). Содержание моноцитов CD14⁺ и CD16⁺ во фракции CD14⁺ с деплецией CD16⁺ составляло ($80,6 \pm 4,5$) и ($3,4 \pm 0,5$)%, а во фракции моноцитов CD14⁺ без деплеции CD16⁺ – ($64,8 \pm 3,5$) и ($27,2 \pm 3,4$)% соответственно (рис. 1).

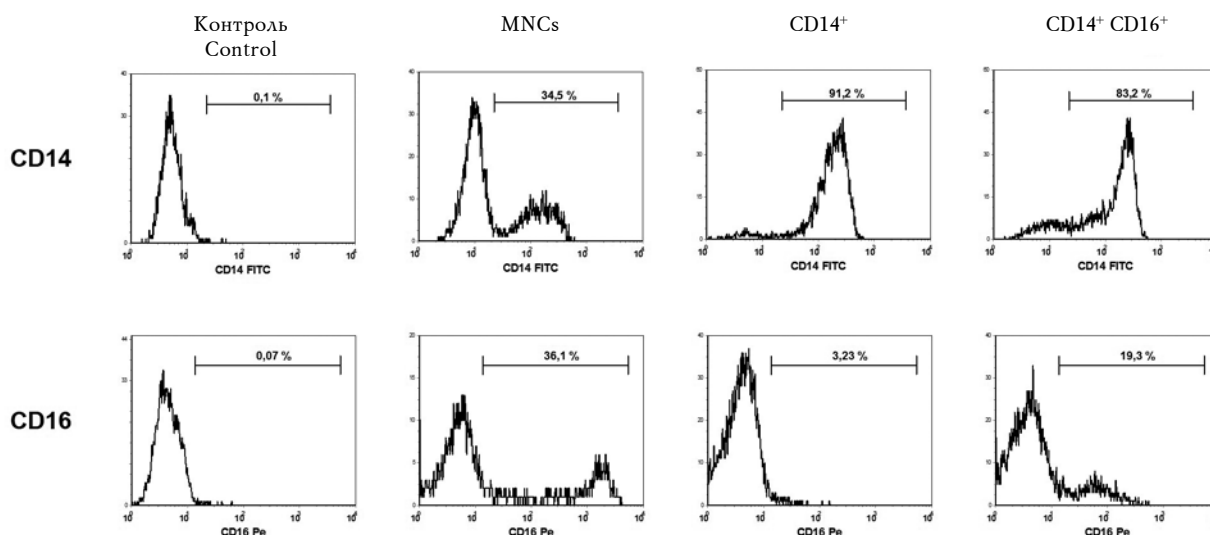


Рис. 1. Экспрессия антигенов CD14 и CD16 до и после магнитной сепарации: репрезентативные гистограммы флуоресценции антигенов CD14 и CD16, экспрессируемых мононуклеарными клетками (MNCs) до магнитной сепарации, а также выделенные субпопуляциями CD14⁺ моноцитов с деплецией (моноциты CD14⁺CD16⁻) и без деплеции клеток CD16⁺ (моноциты CD14⁺CD16⁺)

Fig. 1. CD14 and CD16 molecule expression before and after immunomagnetic selection: the flow cytometric histograms represent CD14 and CD16 antigens expressed by the start MNCs and final enriched fractions of CD14⁺ monocytes with CD16⁺ cell depletion (CD14⁺CD16⁻ monocytes) and without CD16⁺ cell depletion (CD14⁺CD16⁺ monocytes) using immunomagnetic negative selection

Дендритные клетки генерировали путем культивирования выделенных моноцитов CD14⁺CD16⁻ и CD14⁺CD16⁺ в 6-луночных планшетах (Nunc, Дания) в течение 3–4 сут в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, Биолот, г. Санкт-Петербург), в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария). Для индукции созревания DC на 4-е сут вносили липополисахарид (ЛПС, 10 мкг/мл, LPS E. coli 0114:B4, Sigma-Aldrich) и продолжали культивировать в течение 24 ч. В отдельной серии экспериментов на этапе дифференцировки за 1 сут до внесения ЛПС в культуры DC добавляли дексаметазон (10^{-6} М).

Оценку фенотипа IFN-DC проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) с использованием FITC-

или Ре-меченных моноклональных анти-CD14, -CD83, -HLA-DR, -CD123, -CD86, -TLR-2 и B7-H1/CD274 антител (BD PharMingen, США). В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичными флуорохромами (BD PharMingen, США).

Стимуляторную активность IFN-DC оценивали в аллогенной смешанной культуре лимфоцитов (алло-СКА), используя в качестве отвечающих клеток аллогенные MNC доноров ($0,1 \times 10^6$ /лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови AB (IV) группы при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Стимуляторами служили IFN-DC в соотношении MNC : DC = 10 : 1. Пролиферативный ответ оценивали на 5-е сут радиометрически по включению ³H-тимидина (1 мкКю на лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ

Statistica 6.0. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический *W*-критерий Вилкоксона (для связанных, парных выборок). Для анализа взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (r_s). Результаты представлены в виде $M \pm SE$, где M – среднее значение, SE – ошибка среднего. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Учитывая малочисленность в общем пуле моноцитов крови клеток $CD16^+$, получение достаточного количества промежуточных и неклассических моноцитов для дальнейшего исследования и генерации из них DC представлялось технически сложным. Поэтому был использован метод магнитной сепарации для выделения из MNC обогащенной популяции моноцитов $CD14^+$ с деплецией и без деплеции клеток $CD16^+$ ($CD14^+CD16^-$ и $CD14^+CD16^+$ субпопуляции соответственно). Такой подход позволял выяснить, каким образом присутствие или отсутствие промежуточных и неклассических моноцитов $CD16^+$ влияет на фе-

нотип и функции IFN-DC. Моноциты $CD14^+CD16^-$ и $CD14^+CD16^+$ получали от одних и тех же доноров, что давало возможность сравнить два типа генерируемых DC ($CD16^-$ Мо-DC и $CD16^+$ Мо-DC), полученных от одного индивида.

Фенотипический анализ DC, генерированных из моноцитов $CD14^+CD16^-$ и $CD14^+CD16^+$, показал, что присутствие клеток $CD16^+$ в общей популяции моноцитов ассоциировалось с почти двукратным уменьшением количества DC промежуточной степени зрелости ($CD14^+CD83^+$) по сравнению с культурами $CD16^-$ Мо-DC (рис. 2, *a*). При этом содержание зрелых $CD14^+CD83^+$ DC и клеток с незрелым фенотипом ($CD14^+CD83^-$) среди $CD16^-$ Мо-DC и $CD16^+$ Мо-DC значимо не различалось. Тем не менее среди DC, экспрессирующих CD83, относительное содержание (%) зрелых клеток $CD83^+CD14^-$ в популяции $CD16^+$ Мо-DC было в среднем в 1,7 раза выше ($p = 0,076$), чем в популяции $CD16^-$ Мо-DC (рис. 2, *b*). Таким образом, отсутствие клеток $CD16^+$ в общей популяции моноцитарных предшественников ведет к их дифференцировке в IFN-DC с менее зрелым фенотипом и преобладанием DC промежуточной степени зрелости.

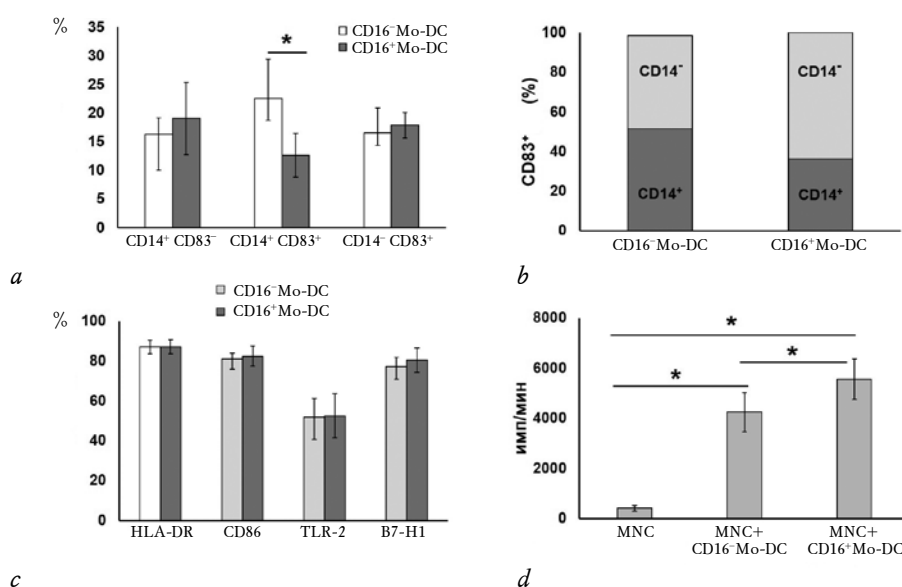


Рис. 2. Фенотип и аллостимуляторная активность IFN-DC, генерированных из $CD16^-$ и $CD16^+$ моноцитов: *a* – DC, экспрессирующие CD14 и CD83, $n = 7$, %; *b* – $CD14^-$ и $CD14^+$ среди $CD83^+$ DC ($n = 7$), %; *c* – HLA-DR $^+$ ($n = 8$), CD86 $^+$ ($n = 7$), B7-H1 $^+$ ($n = 7$) и TLR-2 $^+$ ($n = 6$) в популяциях $CD16^-$ Мо-DC и $CD16^+$ Мо-DC, %; *d* – пролиферативный ответ MNC в алло-СКЛ в отсутствии IFN-DC (MNC) и присутствии указанных типов IFN-DC, имп/мин, $M \pm SE$. Здесь и на рис. 3, 4: * $p < 0,05$ (непараметрический *W*-критерий Вилкоксона)

Fig. 2. Phenotype and allostimulatory activity of $CD16^-$ and $CD16^+$ monocyte-derived IFN-DCs: *a* – the relative number of DCs expressing CD14 and CD83, $n = 7$; *b* – the proportion of $CD14^-$ and $CD14^+$ cells among $CD83^+$ DCs, $n = 7$; *c* – the relative number of HLA-DR $^+$ ($n = 8$), CD86 $^+$ ($n = 7$), B7-H1 $^+$ ($n = 7$) and TLR-2 $^+$ ($n = 6$) cells in $CD16^-$ Mo-DC and $CD16^+$ Mo-DC cultures; *d* – and proliferative response of MNCs in allo-MLC test (cpm) in the absence of IFN-DCs (MNCs), as well as in presence of signed subtypes of IFN-DCs in allo-MLC test, $M \pm SE$. * Here and at Fig. 3, 4: $p < 0.05$ (nonparametric Wilcoxon Test)

Популяции CD16⁻Мо-DC и CD16⁺Мо-DC были сопоставимы по относительному содержанию клеток, экспрессирующих HLA-DR и CD86, участвующих в презентации антигенов и активации наивных Т-клеток. При этом оба типа DC не различались по количеству клеток, экспрессирующих ингибиторные (толерогенные) молекулы B7-H1 и TLR-2 (см. рис. 2, *c*).

Оценка стимуляторной активности IFN-DC в алло-СКЛ показала (рис. 2, *d*), что способность CD16⁺Мо-DC индуцировать пролиферативный ответ Т-клеток на аллоантигены была в среднем на 63% (IQR 18–76%) выше, чем у CD16⁻Мо-DC ($p = 0,028$). При этом аллостимуляторная активность CD16⁺Мо-DC находилась в прямой корреляционной связи с долей CD86⁺ DC ($r_s = 0,69$; $p = 0,027$) и отрицательно коррелировала с количеством TLR-2⁺ DC ($r_s = -0,72$; $p = 0,1$). В свою очередь, аллостимуляторная активность CD16⁻Мо-DC прямо коррелировала с содержанием CD14⁺CD83⁺DC и CD14⁻CD83⁺DC ($r_s = 0,84$; $p = 0,038$). Таким образом, более низкая аллостимуляторная активность CD16⁻Мо-DC, по-видимому, обусловлена меньшей степенью зрелости этой популяции IFN-DC, тогда как для CD16⁺Мо-DC эта функция детерминруется балансом костимуляторных (CD86) и ингибиторных (TLR2) молекул.

Поскольку одним из ключевых медиаторов толерогенной активности DC являются глюкокортикоиды, на следующем этапе было изучено влияние деплеции моноцитов CD16⁺ на чувствительность генерируемых IFN-DC к дексаметазону. Добавление дексаметазона на этапах генерации CD16⁻Мо-DC и CD16⁺Мо-DC сопровождалось практически двукратным возрастанием количества незрелых CD14⁺CD83⁻ и снижением доли зрелых CD14⁻CD83⁺DC (рис. 3). Эти изменения были более выражены и статистически значимы в популяции CD16⁺Мо-DC (рис. 3, *a*), тогда как в культурах CD16⁻Мо-DC проявлялись в виде отчетливого тренда ($p = 0,07–0,11$). Таким образом, CD16⁺Мо-DC более чувствительны к действию дексаметазона, что подтверждалось при анализе изменений под действием дексаметазона соотношения клеток CD14⁻ и CD14⁺ среди DC, экспрессирующих CD83 (рис. 3, *b*). Обработка дексаметазоном CD16⁺Мо-DC приводила к более выраженному сдвигу баланса в сторону клеток промежуточной степени зрелости, коэкспрессирующих CD14 и CD83 ($p = 0,028$). В то же время в культурах CD16⁻Мо-DC изменение соотношения менее зрелых CD14⁺CD83⁺ и зрелых CD14⁻CD83⁺DC не было статистически достоверным ($p > 0,05$).

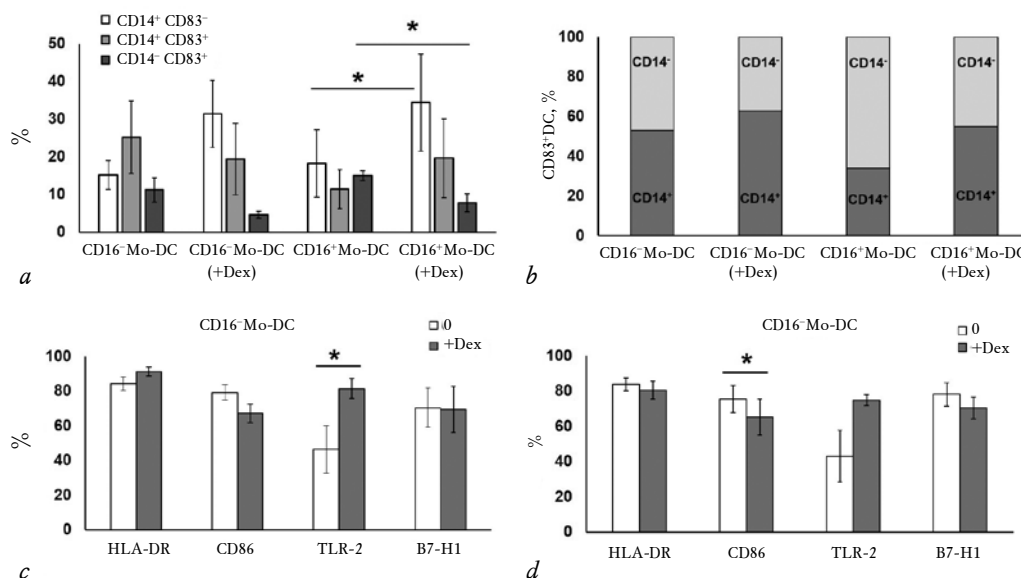


Рис. 3. Влияние дексаметазона на фенотип IFN-DC, генерированных из моноцитов CD16⁻ и CD16⁺: *a* – DC, экспрессирующие CD14 и CD83 ($n = 6$); *b* – CD14⁻ и CD14⁺ среди CD83⁺DC ($n = 6$); *c*, *d* – HLA-DR⁺ ($n = 6$), CD86⁺ ($n = 6$), B7-H1⁺ ($n = 6$) и TLR-2⁺ ($n = 4$) в популяциях CD16⁻Мо-DC и CD16⁺Мо-DC, генерированных в стандартных условиях и в присутствии дексаметазона (+Dex), %, $M \pm SE$

Fig. 3. The effect of dexamethasone on the phenotype of CD16⁻ and CD16⁺ monocyte-derived IFN-DCs: *a* – DC expressing CD14 and CD83 ($n = 6$); *b* – the proportion of CD14⁻ and CD14⁺ cells among CD83⁺DCs ($n = 6$); *c*, *d* – the relative number of HLA-DR⁺ ($n = 6$), CD86⁺ ($n = 6$), B7-H1⁺ ($n = 6$) and TLR-2⁺ ($n = 4$) cells in CD16⁻Mo-DCs and CD16⁺Mo-DCs generated under standard conditions and in the presence of dexamethasone (+Dex), %, $M \pm SE$

Добавление дексаметазона на этапе дифференцировки моноцитов $CD14^+CD16^-$ и $CD14^+CD16^+$ в DC по-разному влияло на экспрессию костимуляторных и толерогенных молекул (CD86 и TLR-2 соответственно). Из данных рисунка следует (рис. 3, *c* и *d*), что под действием дексаметазона отмечалось снижение относительного содержания клеток $CD86^+$: статистически значимое в популяции $CD16^+$ Mo-DC ($p = 0,04$), а в культурах $CD16^-$ Mo-DC в виде отчетливой тенденции ($p = 0,12$). При этом дексаметазон индуцировал достоверное возрастание клеток TLR-2⁺ среди $CD16^-$ Mo-DC и в культурах $CD16^+$ Mo-DC – в виде тренда. Как следствие, в популяциях $CD16^-$ Mo-DC и $CD16^+$ Mo-DC после контакта с дексаметазоном наблюдалась инверсия индекса соотношения клеток $CD86^+/TLR-2^+$ и его снижение в среднем с $(2,3 \pm 0,9)$ до $(0,75 \pm 0,05)$ расч. ед. ($p = 0,06$), что свидетельствовало о сдвиге балан-

са от стимуляторных $CD86^+$ DC в сторону толерогенных клеток TLR-2⁺.

Обработка дексаметазоном не оказывала влияния на экспрессию HLA-DR антигенов и ингибиторной молекулы B7-H1. Тем не менее анализ коэкспрессии CD86 и B7-H1 показал (рис. 4), что дексаметазон более чем в два раза увеличивал относительное содержание клеток $CD86^+B7-H1^+$ как в популяции $CD16^-$ Mo-DC, так и среди $CD16^+$ Mo-DC ($p = 0,04$). Количество клеток, коэкспрессирующих CD86 и B7-H1, при этом снижалось, достигая статистически значимого уровня в культурах $CD16^+$ Mo-DC ($p = 0,04$).

Сравнительный анализ аллостимуляторной активности IFN-DC показал (рис. 5), что дексаметазон подавлял способность как $CD16^-$ Mo-DC, так и $CD16^+$ Mo-DC индуцировать пролиферативный ответ MNC на аллоантигены ($p = 0,008$ и $p = 0,005$ соответственно).

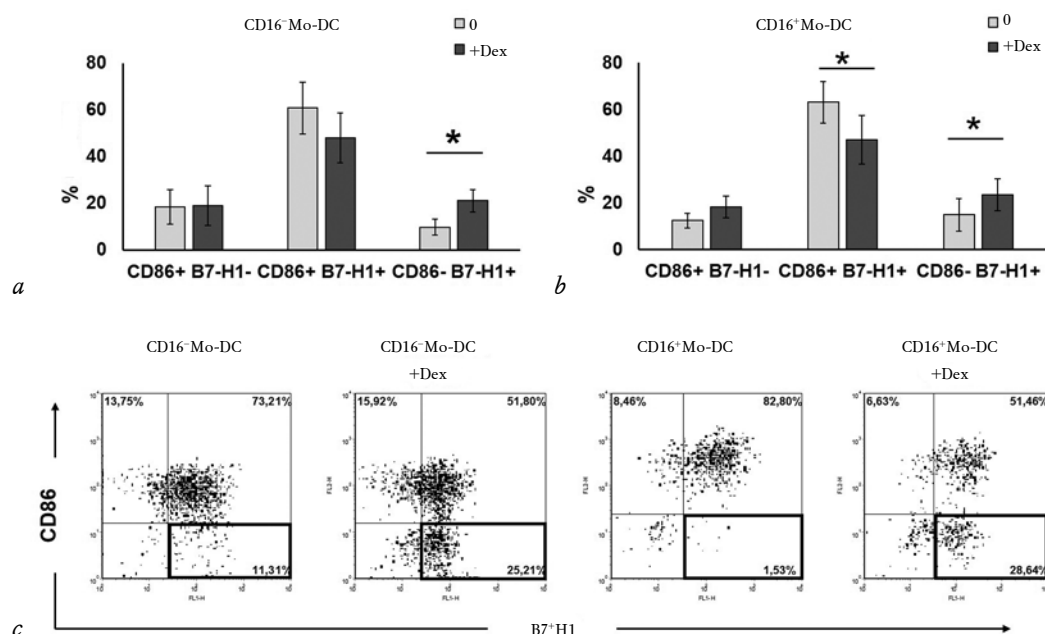


Рис. 4. Влияние дексаметазона на экспрессию CD86 и B7-H1 на IFN-DC, генерированных из $CD16^-$ и $CD16^+$ моноцитов: DC, экспрессирующие CD86 и B7-H1, в популяциях $CD16^-$ Mo-DC (*a*) и $CD16^+$ Mo-DC (*b*), генерированных в стандартных условиях и с дексаметазоном (+Dex), %, $M \pm SE$. Представлены индивидуальные DotPlot гистограммы распределения $CD16^-$ Mo-DC и $CD16^+$ Mo-DC, генерированных стандартно и в присутствии дексаметазона по флуоресценции FITC-меченных анти-B7-H1- и PE-меченных анти-CD86-антител (*c*). Левый верхний квадрант – $CD86^+B7-H1^-$ клетки, правый верхний квадрант – $CD86^+B7-H1^+$ клетки, правый нижний квадрант – $CD86^-B7-H1^+$ клетки

Fig. 4. The effect of dexamethasone on CD86 and B7-H1 expression on $CD16^-$ and $CD16^+$ monocyte-derived IFN-DC. The data are presented in the form of $M \pm SE$ of the relative number of DC expressing CD86 and B7-H1 in $CD16^-$ Mo-DC (*a*) and $CD16^+$ Mo-DC cultures (*b*) generated under standard conditions and in the presence of dexamethasone (+Dex). Representative flow cytometric dot plots of co-staining of FITC-conjugated anti-B7-H1 and PE-conjugated anti-CD86 monoclonal antibodies on $CD16^-$ Mo-DC and $CD16^+$ Mo-DC generated under standard conditions and in the presence of dexamethasone (+Dex) are illustrated at (*c*). Upper left quadrant – $CD86^+B7-H1^-$ cells, upper right quadrant – $CD86^+B7-H1^+$ cells, lower right quadrant – $CD86^-B7-H1^+$ cells

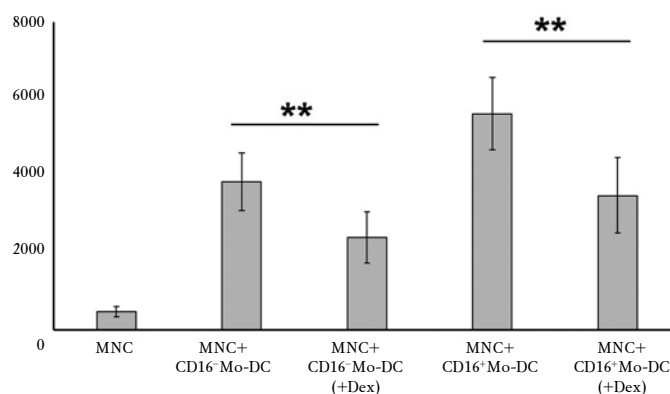


Рис. 5. Влияние дексаметазона на аллостимуляторную активность IFN-DC, генерированных из CD16⁻ и CD16⁺ моноцитов: пролиферативный ответ MNC в алло-СКЛ в отсутствии IFN-DC (MNC) и присутствии CD16⁻ Mo-DC и CD16⁺ Mo-DC, генерированных в стандартных условиях и с дексаметазоном (+Dex), имп/мин, $M \pm SE$. ** $p < 0,01$ (непараметрический W-критерий Вилкоксона).

Fig. 5. The effect of dexamethasone on allostimulatory activity of CD16⁻ and CD16⁺ monocyte-derived IFN-DC: proliferative response of MNC in allo-MLC test in the absence of IFN-DC (MNC), as well as in presence of CD16⁻ Mo-DC and CD16⁺ Mo-DC cultures generated under standard conditions and in the presence of dexamethasone (+Dex), cpm, $M \pm SE$. ** $p < 0.01$ (nonparametric Wilcoxon test)

Одной из причин снижения функциональной активности DC после обработки дексаметазоном является гормон-индуцированное повышение количества DC, экспрессирующих ко-ингибиторные (толерогенные) молекулы (B7-H1, TLR-2). Действительно, проведенный корреляционный анализ показал, что аллостимуляторная активность обеих исследуемых популяций, обработанных дексаметазоном, находится в обратной взаимосвязи с содержанием среди них клеток CD86⁻B7-H1⁺ ($rS = -0,72$; $p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе показано, что популяции моноцитов CD14⁺, содержащие и истощенные по клеткам CD16⁺, дифференцируются в DC, различающиеся по фенотипу и функциям. Промежуточные и неклассические моноциты CD16⁺ дифференцируются в IFN-DC с большей степенью зрелости по сравнению с DC, полученными из популяции классических клеток CD14⁺CD16⁻. Так, в отличие от CD16⁻ Mo-DC для CD16⁺ Mo-DC характерно меньшее количество клеток CD14⁺CD83⁺ промежуточной степени зрелости, преобладание CD14-негативных клеток в структуре CD83⁺DC, а также более выраженная способность индуцировать пролиферативный ответ в алло-СКЛ. Несмотря на отсутствие различий в экспрессии стимуляторных (HLA-DR, CD86) и ингибиторных молекул (B7-H1, TLR-2) на CD16⁺ Mo-DC и CD16⁻ Mo-DC, более низкая аллостимуляторная активность DC, генерированных из классических

моноцитов CD14⁺CD16⁻, по-видимому, обусловлена меньшей степенью зрелости этой популяции IFN-DC, тогда как для CD16⁺ Mo-DC эта функция детерминирована балансом костимуляторных (CD86) и ингибиторных (TLR-2) молекул.

Полученные данные согласуются с результатами других авторов. Показано, например, что повышение количества клеток CD16⁺ среди общего пула циркулирующих моноцитов ассоциируется с более зрелым статусом генерированных DC *in vitro* [13]. Очевидно, неклассические клетки CD14⁺CD16⁺⁺ являются более зрелой формой моноцитов. Об этом свидетельствует более выраженная (по сравнению с классическими и промежуточными моноцитами) экспрессия проапоптотических и антипролиферативных генов, ассоциированных с высоко дифференцированным статусом клеток; более высокая экспрессия антигенов МНС II класса и костимуляторных молекул; низкая фагоцитарная и повышенная аллостимуляторная активность, а также меньшая длина теломер [6, 14, 15]. Кроме того, именно в неклассических моноцитах экспрессируется определенный набор генов (*SIGLEC10*, *CD43*, *RARA*, *IRF8*), имеющих критическое значение для генерации DC [6, 16]. Соответственно, можно предположить, что моноциты CD14⁺CD16⁺⁺ в наибольшей степени детерминированы к дифференцировке в DC с иммуностимуляторными свойствами. Однако этим данным противоречит работа L.B. Boyette с соавт., которые показали, что только популяция классических моноцитов

CD14⁺CD16⁻ может быть предшественниками DC [7]. По-видимому, в данном случае важную роль играют способы выделения моноцитов, а также условия культивирования моноцитов, в частности применение GM-CSF и IL-4 для индукции дифференцировки DC. Нами впервые показано, что деплеция CD16⁺ из общего пула моноцитов не влияет на их способность дифференцироваться в DC при использовании IFN α вместо IL-4. При этом присутствие моноцитов CD16⁺, как клеток-прекурсоров с большей степенью зрелости, позволяет получить INF-DC с фенотипом и аллостимуляторной активностью, характерной для более зрелых DC.

Известно, что при различных стресс-реакциях, сопряженных с повышением уровня катехоламинов и глюкокортикоидов в крови, происходят активация моноцитов и изменение их субпопуляционного состава [4], что, в свою очередь, может отражаться на процессах дифференцировки и созревания DC. В настоящем исследовании впервые охарактеризовано влияние дексаметазона на созревание и функции IFN-DC, генерированных из субпопуляций моноцитов CD14⁺, оппозитных по экспрессии CD16. Показано, что как CD16⁺Мо-DC, так и CD16⁻Мо-DC подвержены супрессорному эффекту дексаметазона, который проявляется задержкой созревания DC, сдвигом баланса соотношения CD86⁺/TLR-2⁺ в сторону толерогенных клеток TLR-2⁺, а также ингибированием стимуляторной активности IFN-DC в алло-СКЛ.

Интересно отметить, что доля клеток TLR-2⁺, ассоциированных с толерогенным фенотипом DC, в ответ на добавление дексаметазона значительно возрастала только в популяции CD16⁻Мо-DC, тогда как для CD16⁺Мо-DC эти изменения проявлялись в виде тенденции. Характерно, что классические моноциты CD14⁺CD16⁻ отличаются от моноцитов, экспрессирующих CD16⁺, более выраженной экспрессией TLR-2 в ответ на бактериальные антигены (ЛПС, пептидогликаны, энтеротоксин В *St. aureus*) [17]. По-видимому, присутствие дексаметазона в культурах IFN-DC на этапе конечного созревания усиливает эффект ЛПС на экспрессию TLR-2 на CD16⁻Мо-DC, поскольку интактные ЛПС-стимулированные CD16⁻Мо-DC и CD16⁺Мо-DC не различались по этому показателю.

В отличие от TLR-2 уровень экспрессии ко-ингибиторной молекулы B7-H1 при добавлении дексаметазона значительно не менялся в популяциях CD16⁻Мо-DC и CD16⁺Мо-DC. Следует отметить, что роль B7-H1 в биологии DC до конца не ясна. Показано, в частности, что молекула B7-

H1, экспрессируемая на DC, участвует не только в индукции апоптоза и анергии Т-клеток [18], но обладает также протективной функцией, обеспечивая устойчивость DC к лизису со стороны цитотоксических Т-клеток [19]. В настоящем исследовании подавляющая часть интактных CD16⁻Мо-DC и CD16⁺Мо-DC коэкспрессировали B7-H1 и CD86 (см. рис. 4), обладая при этом выраженной аллостимуляторной активностью. Добавление дексаметазона приводило к двукратному увеличению количества CD86⁺B7-H1⁺DC, одновременно снижая число клеток CD86⁺B7-H1⁺. Схожие результаты были получены J.-H. Le с соавт., которые в экспериментальных моделях показали, что различные толерогенные стимулы, в том числе и дексаметазон, приводят к увеличению количества CD86⁺B7-H1⁺ среди DC, индуцированных IL-4 [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что IFN α -индуцированные DC эффективно генерируются из циркулирующих моноцитов CD14⁺, как обогащенных, так и истощенных по клеткам CD16⁺. Тем не менее наличие в общем пуле моноцитарных предшественников CD16⁺ ассоциируется с дифференцировкой IFN-DC с более зрелым фенотипом и высокой аллостимуляторной активностью. DC, генерированные из субпопуляций моноцитов, оппозитных по экспрессии CD16, характеризуются чувствительностью к супрессорному эффекту дексаметазона. При этом толерогенное действие дексаметазона в субпопуляциях CD16⁻Мо-DC и CD16⁺Мо-DC может реализовываться с вовлечением различных механизмов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J.M., Liu Y.-J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010; 116: e74–80. DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558.
2. Feng A.-L., Zhu J.-K., Sun J.-T., Yang M.-X., Neckenig M.R., Wang X.-W., Shao Q.-Q., Song B.-F., Yang Q.-F., Kong B.-H., Qu X. CD16⁺ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 164 (1): 57–65. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04321.x.
3. Chara L., Sánchez-Atrio A., Pírez A., Cuende E., Albarrón F., Turrián A., Chevarría J., del Barco A.A., Sánchez M.A.,

- Monserrat J., Prieto A., de la Hera A., Sanz I., Diaz D., Alvarez-Mon M. The number of circulating monocytes as biomarkers of the clinical response to methotrexate in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J. Transl. Med.* 2015; 13: 2. DOI: 10.1186/s12967-014-0375.y.
4. Wong K.L., Yeap W.H., Tai J.J.Y., Ong S.M., Dang T.M., Wong S.C. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* 2012; 53 (1–3): 41–57. DOI: 10.1007/s12026-012-8297-3.
 5. Bakdash G., Sittig S.P., Dijk T. van, Figdor C.G., Vries I.J.M. de. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front. Immunol.* 2013; 4: 53 DOI: 10.3389/FIMMU.2013.00053.
 6. Ancuta P., Liu K.-Y., Misra V., Wacleche V., Gosselin A., Zhou X., Gabuzda D. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC Genomics.* 2009; 10: 403. DOI: 10.1186/1471-2164-10-403.
 7. Boyette L.B., Macedo C., Hadi K., Elinoff B.D., Walters J.T., Ramaswami B., Chalasani G., Taboas J.M., Lakkis F.G., Metes D.M. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One.* 2017; 12 (4): e0176460. DOI: 10.1371/journal.pone.0176460.
 8. Thurner B., Rüder C., Dieckmann D., Heuer M., Kruse M., Glaser A., Keikavoussi P., Kämpgen E., Bender A., Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J. Immunol. Methods.* 1999; 223: 1–15. DOI: 10.1016/S0022-1759(98)00208-7.
 9. Papewalis C., Jacobs B., Wuttke M., Ullrich E., Baehring T., Fenk R., Willenberg H.S., Schinner S., Cohnen M., Seissler J., Zacharowski K., Scherbaum W.A., Schott M. IFN- skews monocytes into CD56+ -expressing dendritic cells with potent functional activities in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 2008; 180 (3): 1462–1470. DOI: 10.4049/jimmunol.180.3.1462.
 10. Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Мишинов С.В., Ступак В.В., Останин А.А., Черных Е.Р. CCL19/CCL21-зависимый хемотаксис дендритных клеток в норме и при злокачественных опухолях головного мозга. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2014; 158 (12): 752–756. [Tyrinova T.V., Leplina O.Y., Tikhonova M.A., Mishinov S.V., Stupak V.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. CCL19/CCL21-dependent chemotaxis of dendritic cells in healthy individuals and patients with brain tumors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2014; 158 (12): 752–756 (in Russ.)]. DOI: 10.1007/s10517-015-2862-4.
 11. Leplina O. Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Interferon alpha induces generation of semi-mature dendritic cells with high pro-inflammatory and cytotoxic potential. *Cytokine.* 2015; 71: 1–7. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.07.258.
 12. Курочкина Ю.Д., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Баторов Е.В., Сизиков А.Э., Останин А.А., Черных Е.Р. Влияние дексаметазона на интерферон- α - индуцированную дифференцировку моноцитов в дендритные клетки. *Медицинская иммунология.* 2016; 18 (4): 347–356. [Kurochkina Y.D., Leplina O.Y., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Batorov E.V., Sizikov A.E., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Effect of dexamethasone on interferon- α -induced differentiation of monocytes to dendritic cells. *Med. Immunol.* 2016; 18 (4): 347–356. (in Russ.)]. DOI: 10.15789/1563-0625-2016-4-347-356.
 13. Dopheide J.F., Zeller G.C., Kuhlmann M., Girndt M., Sester M., Sester U. Differentiation of monocyte derived dendritic cells in end stage renal disease is skewed towards accelerated maturation. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2015; 24 (2): 257–266. DOI: 10.17219/acem/40463.
 14. Wong K.L., Tai J.J.-Y., Wong W.-C., Han H., Sem X., Yeap W.-H., Kourilsky P., Wong S.-C. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 2011; 118 (5): e1631. DOI: 10.1182/blood-2010-12-326355.
 15. Merino A., Buendia P., Martin-Malo A., Aljama P., Ramirez R., Carracedo J. Senescent CD14⁺CD16⁺ Monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J. Immunol.* 2011; 186 (3): 1809–1815. DOI: 10.4049/jimmunol.1001866.
 16. Gren S.T., Rasmussen T.B., Janciauskiene S., Hekansson K., Gerwien J.G., Grip O. A single-cell gene-expression profile reveals inter-cellular heterogeneity within human monocyte subsets. *PLoS One.* 2015; 10 (12): e0144351. DOI: 10.1371/journal.pone.0144351.
 17. Skinner N.A., MacIsaac C.M., Hamilton J.A., Visvanathan K. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14dimCD16⁺ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 2005; 141 (2): 270–278. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2005.02839.x.
 18. Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Leplina O.Y., Shevela E.Y., Nikonov S.D., Zhdanov O.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Cytotoxic activity of dendritic cells as a possible mechanism of negative regulation of T lymphocytes in pulmonary tuberculosis. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012: 1–9. DOI: 10.1155/2012/628635.
 19. Chen L., Azuma T., Yu W., Zheng X., Luo L., Chen L. B7-H1 maintains the polyclonal T cell response by protecting dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018; 115 (12): 3126–3131. DOI: 10.1073/pnas.1722043115.
 20. Lee J.-H., Park C.-S., Jang S., Kim J.-W., Kim S.-H., Song S., Kim K., Lee C.-K. Tolerogenic dendritic cells are efficiently generated using minocycline and dexamethasone. *Scientific Reports.* 2017; 7: 15087. DOI: 10.1038/s41598-017-15569-1.

Вклад авторов

Черных Е.Р., Останин А.А. – разработка концепции и дизайна. Тыринова Т.В., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Сахно Л.В. – культуральные работы. Тихонова М.А. – пробоподготовка для цитометрического анализа, цитометрический анализ проб. Курочкина Ю.Д., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Черных Е.Р. – анализ и интерпретация данных. Тыринова Т.В., Черных Е.Р., Останин А.А. – подготовка текста статьи. Останин А.А., Черных Е.Р. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Черных Елена Рэмовна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-2346-6279.

Тыринова Тамара Викторовна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Леплина Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-3169-8643.

Тихонова Марина Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-2366-1667.

Курочкина Юлия Дмитриевна, аспирант, лаборатория клеточной иммунотерапии НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-7080-777X.

Олейник Екатерина Александровна, аспирант, лаборатория клеточной иммунотерапии НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-1044-3564.

Сахно Людмила Васильевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-3290-7910.

Останин Александр Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0001-6895-938X.

(✉) Черных Елена Рэмовна, e-mail: ct_lab@mail.ru.

Поступила в редакцию 03.09.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Authors contribution

Chernykh E.R., Ostanin A.A. – conception and design; Tyrinova T.V., Kurochkina Yu. D., Oleynik E.A., Sakhno L.V. – works with cultures. Tikhonova M.A. – preparation of samples for cytometry, cytometry of the samples. Kurochkina Yu. D., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Chernykh E.R., – analysis and interpretation of data. Tyrinova T.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A. – drafting of the manuscript. Ostanin A.A., Chernykh E.R. – final approval of the manuscript for publication.

Authors information

Chernykh Elena R., DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2346-6279.

Tyrinova Tamara V., PhD, Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Leplina Olga Yu., DM, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3169-8643.

Tikhonova Marina A., PhD, Superior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-2366-1667.

Kurochkina Yuliya D., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7080-777X.

Oleynik Ekaterina A., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1044-3564.

Sakhno Ludmila V., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation

Ostanin Alexander A., DM, Professor, Main Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-6895-938X.

(✉) Chernykh Elena R., e-mail: ct_lab@mail.ru.

Received 03.09.2018

Accepted 17.12.2018

Субпопуляции моноцитов крови у больных с генерализованной гипоксией

Чумакова С.П.¹, Винс М.В.¹, Уразова О.И.^{1,4}, Азарова Д.А.¹, Шипулин В.М.^{1,2},
Пряхин А.С.², Букреева Е.Б.¹, Буланова А.А.¹, Кошель А.П.^{1,5}, Чурина Е.Г.^{1,3},
Ситникова А.В.¹, Гарганеева Н.П.¹, Новицкий В.В.^{1,4}

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт (НИИ) кардиологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук (Томский НИМЦ РАН)
Россия, 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

⁴ Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники (ТУСУР)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 40

⁵ Городская клиническая больница (ГКБ) № 3 им. Б.И. Альперовича
Россия, 634045, г. Томск, ул. Нахимова, 3

РЕЗЮМЕ

Цель работы – установить общие закономерности и особенности дифференцировки моноцитов крови на четыре субпопуляции (классические (CD14^{hi}CD16⁻), промежуточные (CD14^{hi}CD16^{lo}), неклассические (CD14^{lo}CD16^{lo}) и переходные (CD14^{lo}CD16⁻)) при заболеваниях, ассоциированных с циркуляторной и дыхательной гипоксией.

Материалы и методы. Обследованы 18 больных ишемической болезнью сердца (ИБС), 12 больных ишемической кардиомиопатией (ИКМП), 14 больных с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), 15 больных с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких (ТБЛ) и 12 здоровых доноров. В цельной крови определяли относительное количество различных субпопуляций моноцитов методом проточной цитометрии. Полученные результаты анализировали статистическими методами.

Результаты. Показано, что у больных ХОБЛ определяется увеличение доли классических (80,56 [77,60; 83,55]%) и дефицит промежуточных (10,38 [9,36; 11,26]%), неклассических (6,03 [5,24; 6,77]%) и переходных (2,14 [1,41; 3,92]%) моноцитов в крови по сравнению с группой здоровых доноров ($p < 0,05$). В группах больных с ТБЛ и ИБС обнаруживается повышение количества промежуточных моноцитов (соответственно 26,24 [22,38; 42,88]% и 25,27 [15,78; 31,39]%) на фоне дефицита переходных клеток (1,77 [1,36; 3,74]% и 2,68 [2,63; 4,0]%) при нормальном содержании классических и неклассических форм моноцитов ($p < 0,05$). У больных ИКМП снижение численности неклассических моноцитов (до 5,05 [4,08; 6,58]%) сочетается с нормальным содержанием клеток остальных субпопуляций ($p < 0,05$). Установлена взаимосвязь между численностью классических и промежуточных моноцитов у больных ХОБЛ ($r = -0,63$; $p < 0,05$), ТБЛ ($r = -0,72$; $p < 0,01$), ИБС ($r = -0,59$; $p < 0,05$), ИКМП ($r = -0,58$; $p < 0,05$).

Заключение. При ХОБЛ, ассоциированной с генерализованной гипоксией, увеличение числа классических моноцитов сочетается с дефицитом остальных их субпопуляций в крови. При ТБЛ и ИБС антигенная стимуляция иммунной системы опосредует ускоренную дифференцировку моноцитов из классических в промежуточные формы при снижении числа переходных клеток

вне зависимости от этиологии заболевания (инфекционная или неинфекционная) и вида гипоксии (дыхательная или циркуляторная).

Ключевые слова: субпопуляции моноцитов, ишемическая болезнь сердца, ишемическая кардиомиопатия, хроническая обструктивная болезнь легких, туберкулез легких, гипоксия.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-015-00160/18) и Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 5046 от 28.11.2016).

Для цитирования: Чумакова С.П., Винс М.В., Уразова О.И., Азарова Д.А., Шипулин В.М., Пряхин А.С., Букреева Е.Б., Буланова А.А., Кошель А.П., Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Гарганеева Н.П., Новицкий В.В. Субпопуляции моноцитов крови у больных с генерализованной гипоксией. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 277–285. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-277-285>.

УДК 616.155.33-001.83:612.112.95

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-277-285>

Subpopulations of blood monocytes in patients with generalized hypoxia

Chumakova S.P.¹, Vins M.V.¹, Urazova O.I.^{1,4}, Azarova D.A.¹, Shipulin V.M.²,
Pryakhin A.S.², Bukreeva E.B.¹, Bulanov A.A.¹, Koshel A.P.^{1,5,3}, Churina E.G.^{1,3},
Sitnikova A.V.¹, Garganeeva N.P.¹, Novitskiy V.V.^{1,4}

¹ Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634055, Russian Federation

² Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC) of the Russian Academy of Sciences (RAS)
111A, Kievskaya Str., Tomsk, 634012, Russian Federation

³ National Research Tomsk State University (NR TSU)
36, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

⁴ Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics (TUSUR)
40, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

⁵ City Clinical Hospital № 3 named after B.I. Alperovich
3, Nakhimova Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the work is to establish general regularities and features of differentiation of blood monocytes into 4 subpopulations in diseases associated with circulatory and respiratory hypoxia.

Materials and methods. 18 patients with ischemic heart disease (IHD), 12 patients with ischemic cardiomyopathy (ICMP), 14 patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), 15 patients with newly diagnosed infiltrative pulmonary tuberculosis (PTB) and 12 healthy donors were examined. In whole blood, we determined the relative number of different subpopulations of monocytes by flow cytometry. The results were analyzed by statistical methods.

Results. It is shown that an increase in the number of classical (80.56 [77.60; 83.55]%) and the deficit of intermediate (10.38 [9.36; 11.26]%), non-classical (6.03 [5.24; 6.77]%) and transitional (2.14 [1.41; 3.92] %)

monocytes in the blood is determined in patients with COPD when compared with the group of healthy donors ($p < 0.05$). In groups of patients with PTB and IHD, an increase in the number of intermediate monocytes (26.24 respectively [22.38; 42.88] % and 25.27 [15.78; 31.39]%) and the lack of transitional cells (1.77 [1.36; 3.74]% and 2.68 [2.63; 4.0]%) at the normal content of classical and non-classical forms of monocytes ($p < 0.05$) is detected. In patients with ICMP, a decrease in the number of non-classical monocytes (up to 5.05 [4.08; 6.58]%) is combined with the normal cell content of other subpopulations ($p < 0.05$). The interrelation between the number of classical and intermediate monocytes in patients with COPD ($r = -0.63$; $p < 0.05$), PTB ($r = -0.72$; $p < 0.01$), IHD ($r = -0.59$; $p < 0.05$), ICMP ($r = -0.58$; $p < 0.05$) was established.

Conclusion. In COPD associated with generalized hypoxia, an increase in the number of classical monocytes is combined with a deficiency of their other subpopulations in the blood. In PTB and IHD, antigenic stimulation of the immune system mediates accelerated differentiation of monocytes from classical to intermediate forms with a decrease in the number of transitional cells regardless of the etiology of the disease (infectious or non-infectious) and the type of hypoxia (respiratory or circulatory).

Key words: subpopulations of monocytes, ischemic heart disease, ischemic cardiomyopathy, chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary tuberculosis, hypoxia.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (No. 18-015-00160/18) and the Council on Grants of the President of the Russian Federation for leading scientific schools (NSH-2690.2018.7).

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee under SSMU (Protocol No. 5046 of 28.11.2016).

For citation: Chumakova S.P., Vins M.V., Urazova O.I., Azarova D.A., Shipulin V.M., Pryakhin A.S., Bukreeva E.B., Bulanova A.A., Koshel A.P., Churina E.G., Sitnikova A.V., Garganeeva N.P., Novitskiy V.V. Subpopulations of blood monocytes in patients with generalized hypoxia. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 277–285. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-277-285>.

ВВЕДЕНИЕ

Система мононуклеарных фагоцитов активируется при различных заболеваниях, индуцированных как инфекционными, так и неинфекционными агентами. Данные агенты являются чужеродными для организма и, согласно современным представлениям, активируют иммунокомпетентные клетки с помощью нескольких групп молекул: образов патогенности, или патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), вирусов, бактерий, грибов, простейших и паразитов, которые связываются паттерн-распознающими рецепторами на клетках врожденного иммунитета; антигенов – высокомолекулярных соединений, способных стимулировать лимфоциты после их распознавания антигенспецифическими рецепторами на Т- и В-лимфоцитах; стрессорных молекул – эндогенных молекул, экспрессируемых на мембране клеток организма при опасности повреждения, и образов опасности (danger-associated molecular patterns, DAMPs) – родственной им группы молекул, сигнализирующих о повреждающем действии

физических, химических, биологических (в том числе инфекционных) факторов. Последние также могут распознаваться клетками врожденного иммунитета, некоторые из них – рецепторами для PAMPs [1, 2].

Недавние исследования показали, что существует опосредованное гипоксией увеличение активации и эмиграции иммунных клеток в очаг кислородного голодания [3]. Гипоксия непосредственно стимулирует наработку индуцируемого гипоксией фактора (HIF-1) в различных клетках организма и активирует моноциты (макрофаги), способные продуцировать провоспалительные цитокины, хемокины, прооксиданты, матриксные металлопротеиназы и другие факторы, усугубляющие тканевое повреждение [4]. Стимуляция процесса миграции клеток может быть вызвана индуцированным гипоксией хемокиновым градиентом или независимым от хемокина, но зависимым от HIF-1 α увеличением локомоторной функции моноцитов (макрофагов) в условиях снижения напряжения кислорода ниже определенного уровня [5].

Данные закономерности гипоксического повреждения дополняются новыми сведениями о функциональной гетерогенности моноцитов. В большинстве источников литературы обсуждается наличие трех фенотипических субпопуляций моноцитов у человека – классических, промежуточных и неклассических клеток. Классические моноциты $CD14^{hi}CD16^{-}$ проявляют высокую фагоцитарную активность, первыми эмигрируют из крови в очаг воспаления, где трансформируются в провоспалительные макрофаги [6]. Моноциты $CD14^{hi}CD16^{lo}$ известны как промежуточные клетки с провоспалительной активностью, способные секретировать в большом количестве провоспалительные цитокины (фактор некроза опухоли альфа ($TNF\alpha$), интерлейкин-1 бета ($IL-1\beta$)) [7], индуцировать ангиогенез [8], при патологии повреждать ткани сердца и других органов [9]. Неклассические моноциты с фенотипом $CD14^{lo}CD16^{lo}$ являются предшественниками резидентных тканевых макрофагов. Они более эффективны в отношении презентации антигена и секреции $IL-1$, интерферона альфа ($IFN\alpha$) при слабо выраженной способности к фагоцитозу [10]. О субпопуляции переходных моноцитов ($CD14^{lo}CD16^{-}$) известно мало. Предполагается, что они являются триггерами иммунной активации и дифференцируются из классических моноцитов или являются их предшественниками, так как характеризуются низкой экспрессией $CD14$ [9].

В связи с изложенным выше возникают вопросы о роли гипоксии в дифференцировке моноцитов на субпопуляции, наличии универсальных (типовых) механизмов их созревания при разных заболеваниях, ассоциированных с гипоксией, или же, напротив, уникальности этих процессов для каждой нозологической формы. Широкая распространенность и высокая социальная значимость таких патологий, как хроническая сердечная недостаточность, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и туберкулез легких (ТБЛ) [11], обосновывают необходимость углубленного изучения их патогенеза, включая механизмы разнонаправленной дифференцировки вовлеченных в их развитие и прогрессирование клеток, в частности моноцитов.

Целью исследования явилось установление общих закономерностей и особенностей характера дифференцировки моноцитов крови на классические, промежуточные, неклассические и переходные клетки при заболеваниях, ассоциированных с генерализованной (циркуляторной или дыхательной) гипоксией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 59 больных, в том числе пациенты с ХСН, страдающие недостаточностью кровообращения II–III функционального класса по NYHA ($n = 30$): 18 больных ишемической болезнью сердца (ИБС) (15 мужчин и 3 женщины, возраст 52–63 года) и 12 больных ишемической кардиомиопатией (ИКМП) (11 мужчин и 1 женщина, возраст 49–61 год, фракция выброса левого желудочка $<40\%$, конечный систолический индекс >60 мл/м²). Также обследованы 14 больных (9 мужчин и 5 женщин, возраст 48–64 года), страдающих эмфизематозной формой ХОБЛ в стадии ремиссии; 15 больных (11 мужчин и 4 женщины, возраст 42–60 лет) с впервые выявленным инфильтративным ТБЛ до проведения противотуберкулезной терапии. Критериями исключения из исследования считали наличие гематологических, аутоиммунных и опухолевых заболеваний, вирусного гепатита, ВИЧ-инфекции, острого воспалительного процесса в момент исследования или менее чем за 1 мес до его проведения, отказ от исследования. В контрольную группу вошли 12 человек, находившихся в состоянии относительного здоровья и сопоставимых по полу и возрасту с больными в группах исследования.

У всех обследуемых больных и здоровых доноров утром натощак забирали 5 мл венозной крови, которую стабилизировали гепарином (25 МЕ/мл). В полученной крови определяли относительное количество классических ($CD14^{hi}CD16^{-}$), промежуточных ($CD14^{hi}CD16^{lo}$), неклассических ($CD14^{lo}CD16^{lo}$) и переходных ($CD14^{lo}CD16^{-}$) моноцитов методом проточной цитофлуориметрии (цитофлуориметр Accuri C6 BD Biosciens, США), принимая за 100% все клетки, положительные по $CD14$. Для идентификации моноцитов в цельной крови использовали моноклональные антитела $CD14-FITC$ и $CD16-PE$ (BD Biosciens, США), а также лизирующий раствор (BD Biosciens, США) согласно инструкции производителя.

Для статистического описания результатов исследования вычисляли медиану, 25-й и 75-й перцентили $Me [Q_1-Q_3]$. С целью проверки нулевой гипотезы при сравнении независимых выборок использовали критерий Манна – Уитни. Для оценки взаимосвязи между изучаемыми показателями рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена r . Результаты статистического анализа считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди обследованных больных наиболее значительные изменения субпопуляционного состава

ва моноцитов отмечались у пациентов с ХОБЛ, у которых отмечались увеличение численности классических и дефицит остальных субпопуляций моноцитов в крови (таблица). Подобную реакцию моноцитарно-макрофагальной системы можно объяснить патогенезом заболевания, функциональной ролью классических моноцитов и закономерностями дифференцировки этих клеток. Поскольку основной функцией классических моноцитов является фагоцитоз [12], а главным этиологическим фактором ХОБЛ – мелкодисперсные частицы [13], то увеличение количества классических моноцитов вполне закономерно и отражает состоятельность моноцитопоза при ХОБЛ. Предполагается, что созревание моноцитов происходит последовательно: классические моноциты дифференцируются в промежуточные, а затем в неклассические клетки [14]. В настоящем исследовании это подтверждается отрицательной корреляцией между численностью классических и промежуточных моноцитов

($r = -0,63$; $p < 0,05$) у больных ХОБЛ. При этом снижение численности промежуточных и неклассических моноцитов при ХОБЛ, вероятно, является следствием блокирования процесса завершения дифференцировки классических клеток в другие их формы.

У больных ТБЛ, как и у пациентов с ИБС, обнаруживался избыток промежуточных моноцитов на фоне дефицита переходных клеток при нормальном содержании классических и неклассических моноцитов. Однотипность характера дифференцировки моноцитов при таких столь различных заболеваниях можно объяснить развитием воспаления и гипоксии – типовых патологических процессов, ассоциированных с альтерацией [15]. Известно, что промежуточные моноциты являются провоспалительными, так как активно синтезируют IL-1 β и TNF α [16]. Между тем воспаление и гипоксия имеют место и при ХОБЛ, но субпопуляционный состав моноцитов крови у этих больных иной (см. таблицу).

Т а б л и ц а
T a b l e

Субпопуляционный состав моноцитов крови у больных с циркуляторной и дыхательной гипоксией и здоровых доноров, %, <i>Me</i> [Q_1 – Q_3]					
Subpopulation of blood monocytes in patients with circulatory, respiratory hypoxia and healthy donors, %, <i>Me</i> [Q_1 – Q_3]					
Субпопуляция моноцитов Monocyte subpopulations	Группа обследуемых лиц Group of surveyed persons				
	ИКМП ICMP	ИБС CHD	ХОБЛ COPD	ТБЛ Pulmonary TB	Здоровые доноры Healthy donors
Классические моноциты CD14 ^{hi} CD16 [–] Classical monocytes CD14 ^{hi} CD16 [–]	57,77 [46,35; 79,76] $p = 0,682$	57,23 [49,60; 66,42] $p = 0,155$	80,56 [77,60; 83,55] $p = 0,013$	58,55 [47,21; 70,74] $p = 0,712$	67,75 [64,34; 70,65]
Промежуточные моноциты CD14 ^{hi} CD16 ^{lo} Intermediate monocytes CD14 ^{hi} CD16 ^{lo}	25,06 [4,96; 42,31] $p = 0,813$	25,27 [15,78; 31,39] $p = 0,038$	10,38 [9,36; 11,26] $p = 0,042$	26,24 [22,38; 42,88] $p = 0,004$	14,36 [12,06; 14,98]
Неклассические моноциты CD14 ^{lo} CD16 ^{lo} Nonclassical monocytes CD14 ^{lo} CD16 ^{lo}	5,05 [4,08; 6,58] $p = 0,019$	9,10 [6,02; 17,93] $p = 0,762$	6,03 [5,24; 6,77] $p = 0,011$	9,83 [6,67; 14,50] $p = 0,906$	10,07 [9,34; 13,84]
Переходные моноциты CD14 ^{lo} CD16 [–] Transitional monocytes CD14 ^{lo} CD16 [–]	6,03 [3,58; 10,89] $p = 0,815$	2,68 [2,63; 4,09] $p = 0,027$	2,14 [1,41; 3,92] $p = 0,032$	1,77 [1,36; 3,74] $p = 0,009$	6,80 [5,03; 6,87]

Примечание. ИКМП – ишемическая кардиомиопатия, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких, ТБЛ – туберкулез легких, p – уровень статистической значимости различий показателей по сравнению со здоровыми донорами.

Note. ICMP – ischemic cardiomyopathy, CHD – ischemic heart disease, COPD – chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary TB – pulmonary tuberculosis, p – the level of statistical significance of differences in indicators compared with healthy donors.

По всей видимости, для детерминации созревания моноцитов имеет значение сам факт антигенной природы флогогена независимо от того, является он инфекционным или нет. Туберкулезная инфекция характеризуется проникновением в организм и размножением *Mycobacterium*

tuberculosis, имеющих RAMPs и антигенные детерминанты [15, 17]; атеросклероз коронарных артерий вызван реакцией иммунокомпетентных клеток на модифицированные липопротеины низкой плотности – высокомолекулярные соединения, приобретающие свойства аутоантигенов в результате их

пероксидации, гликозилирования, десИАлирования, фрагментации апопротеина В100 и др. [18]. Известно, что они, также как и РAMPs микроорганизмов, могут распознаваться scavenger-рецепторами моноцитов (макрофагов) и дендритных клеток [1, 19], стимулируя синтез провоспалительных цитокинов при ИБС [20]. Считается, что иммунную функцию взаимодействия с Т-лимфоцитами осуществляют промежуточные моноциты [16], в связи с чем, видимо, их численность возрастает у больных ИБС и пациентов с ТБА (см. таблицу). При этом содержание классических моноцитов отрицательно коррелирует с долей промежуточных клеток в крови как у больных с ТБА ($r = -0,72$; $p < 0,01$), так и у пациентов с ИБС ($r = -0,59$; $p < 0,05$). Развитие ХОБЛ, напротив, индуцировано поступлением в бронхи мелкодисперсных частиц чаще всего неорганического происхождения (дым, профессиональные вредности), представляющих собой факторы, вызывающие в организме экспрессию DAMPs [1, 21]. Возможно, при ХОБЛ в борьбе с инородными объектами эффективными оказываются активно фагоцитирующие клетки, что и вызывает увеличение численности классических моноцитов как путем блокирования их созревания в промежуточные клетки, так и вследствие ускоренной дифференцировки переходных моноцитов в классические (см. таблицу).

Наименее существенные отклонения субпопуляционного состава моноцитов крови от нормы отмечались у больных ИКМП, страдающих, как и пациенты с ИБС, хронической сердечной недостаточностью, у которых отмечалось снижение только числа неклассических моноцитов. Согласно современным представлениям, в основе ИКМП лежат эндотелиальная дисфункция и нарушение сосудистого тонуса мелких коронарных артерий с развитием практически тотальной ишемии миокарда [22]. Данный процесс, вероятно, не сопровождается образованием в организме видоизмененных аутологических субстанций со свойствами антигенов, что объясняет нормальное содержание промежуточных моноцитов в крови у больных ИКМП. Между тем численность этих клеток проявляла отчетливую тенденцию к увеличению и отрицательно коррелировала с долей классических моноцитов в крови ($r = -0,58$; $p < 0,05$), что может быть связано со способностью гипоксии индуцировать синтез провоспалительных цитокинов [4, 5]. Вероятной причиной дефицита неклассических моноцитов в крови у больных ИКМП может быть реципрокное угнетение на фоне воспалительной реакции синтеза противовоспалительных цитокинов, к числу которых

относится IL-4, способный усиливать экспрессию CD16 и угнетать экспонирование CD14 на моноцитах [23].

Еще одной особенностью больных ИКМП было нормальное содержание переходных моноцитов в крови при дефиците неклассических клеток в отличие от других групп пациентов, у которых отмечалась недостаточность переходных клеток на фоне увеличения численности моноцитов другой субпопуляции – промежуточных (при ИБС и ТБА) или классических (при ХОБЛ) (см. таблицу). Возможно, переходные моноциты являются предшественниками указанных субпопуляций моноцитов. Данную закономерность позволяет предположить анализ субпопуляционного состава моноцитов у здоровых доноров, в организме которых структурно-функциональное состояние клеток моноцитарно-макрофагальной системы соответствует физиологическому уровню. Так, у здоровых лиц отмечалось наличие отрицательных взаимосвязей между содержанием переходных и классических моноцитов ($r = -0,60$; $p < 0,05$), а также численностью классических и неклассических клеток ($r = -0,58$; $p < 0,05$) в крови. При этом корреляция между классическими и промежуточными моноцитами у здоровых доноров, как и у пациентов групп исследования, отсутствовала. Следовательно, в норме переходные моноциты, вероятно, дифференцируются в классические, а затем в неклассические клетки. При заболеваниях, связанных с усилением фагоцитарной активности моноцитов (макрофагов) на фоне генерализованной гипоксии, классические моноциты могут изменять свою численность за счет популяции промежуточных моноцитов. При стимуляции моноцитарно-макрофагальной системы модифицированными липопротеинами (при ИБС) и *Mycobacterium tuberculosis* (при ТБА) усиливается созревание классических моноцитов в промежуточные формы, а при патологии, вызванной воздействием экзогенных факторов, не являющихся РAMPs и антигенами (при ХОБЛ), напротив, блокируется. В обоих случаях это влечет ускоренное созревание переходных моноцитов в другие их субтипы, в результате чего содержание переходных форм клеток в крови снижается (см. таблицу). Изолированное влияние гипоксии на дифференцировку моноцитов, по данным настоящего исследования, однозначно определить нельзя, но, возможно, оно связано с угнетением созревания неклассических моноцитов из промежуточных и классических клеток, ввиду чего содержание переходных моноцитов в крови, как их предшественников, у больных ИКМП сохраняется в норме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наличие генерализованной гипоксии в организме человека индуцирует разные формы реагирования моноцитарно-макрофагальной системы в зависимости от природы этиологического фактора. Действие экзогенных факторов физической или химической природы вызывает увеличение численности классических моноцитов в сочетании с формированием дефицита остальных их субпопуляций в крови. PAMPs-опосредованная и антигенная стимуляция иммунной системы запускает универсальную форму реагирования процессов дифференцировки клеток врожденного иммунитета в виде ускоренной генерации моноцитов из классических в промежуточные формы на фоне снижения численности переходных клеток, что характерно для патологии как инфекционного, так и неинфекционного генеза вне зависимости от вида гипоксии – дыхательной или циркуляторной. Изолированное влияние гипоксии на дифференцировку моноцитов, возможно, опосредовано медиаторным ответом тканей, находящихся в состоянии кислородного голодания, и может выражаться в уменьшении численности неклассических моноцитов в крови, что требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Потапнев М.П. Иммунные механизмы стерильного воспаления. *Иммунология*. 2015; 5: 312–318. [Potapnev M.P. Immune mechanisms of sterile inflammation. *Immunology*, 2015; 5: 312–318 (in Russ.)].
- Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010: 752. [Jarilin A.A. Immunology. M.: Geotar-Media Publ., 2010: 752 (in Russ.)].
- Hollander A.P., Corke K.P., Freemont A.J., Lewis C.E. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. *Arthritis Rheum*. 2001; 44: 1540–1544. DOI: 10.1002/1529-0131(200107)44:7<1540::AID-ART277>3.0.CO;2-7.
- Belton M., Brilha S., Manavaki R., Mauri F., Nijran K., Hong Y.T., Patel N.H., Dembek M., Tezera L., Green J., Moores R., Aigbirio F., Al-Nahhas Adil, Fryer T.D., Elkington P.T., Friedland J.S. Hypoxia and tissue destruction in pulmonary TB. *Thorax*. 2016; 71 (12): 1145–1153. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2015-207402.
- Hulsmans M., Sam F., Nahrendorf M. Monocyte and Macrophage Contributions to Cardiac Remodeling. *J. Mol. Cell Cardiol*. 2016; 93: 149–155. DOI: 10.1016/j.jmcc.2015.11.015.
- Semba H., Takeda N., Isagawa T., Sugiura Y., Honda K., Wake M. HIF-1alpha-PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nat. Commun*. 2016; 7: 11635. DOI: 10.1038/ncomms11635.
- Матвеева В.Г., Головкин А.С., Григорьев Е.В. Субпопуляционный состав моноцитов – прогностический маркер тяжелых осложнений системного воспалительного ответа после операции коронарного шунтирования. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2014; 4: 5–12. [Matveeva V.G., Golovkin A.S., Grigoriev E.V. Subpopulation of monocytes is a prognostic marker of severe complications of a systemic inflammatory response after coronary artery bypass surgery. *Complex Problems of Cardiovascular Diseases*. 2014; 4: 5–12 (in Russ.)].
- Barisionea C., Garibaldia S., Ghigliottia G., Fabbia P., Altieria P., Casalea M., Spallarossaa P., Berteroa G., Balbia M., Corsigliab L., Brunellia C. CD14CD16 monocyte subset levels in heart failure patients. *Dis. Marker*. 2010: 115–124. DOI: 10.3233 / DMA-2010-0691.
- Loems Ziegler-Heitbrock, Thomas P.J. Hofer. Toward a Refined Definition of Monocyte Subsets. *Front. Immunol*. 2013; 4: 23. DOI: 10.3389 / fimmu.2013.00023.
- Anker S.D., Egerer K.R., Volk H.D., Kox W.J., Poole-Wilson P.A., Coats A.J. Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure. *Am. J. Cardiol*. 1997; 79: 1426–1430.
- Ханин А.А., Кравец С.А. Хроническая обструктивная болезнь легких и туберкулез: актуальная проблема в реальной практике (обзор литературы). *Вестник современной клинической медицины*. 2017; 6: 60–70. [Khanin A.L., Kravets S.L. Chronic obstructive pulmonary disease and tuberculosis: an actual problem in real practice (literature review). *Bulletin of Modern Clinical Medic*. 2017; 6: 60–70. (in Russ.)]. DOI: 10.20969/VSKM.2017.10(6).60-70.
- Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science (New York, NY)*. 2010; 327 (5966): 656–661. DOI: 10.1126/science.1178331.
- Малыхин Ф.Т., Косторная И.В. Морфологические изменения органов дыхания при хронической обструктивной болезни легких. *Архив патологии*. 2016; 78 (1): 42–50. [Malykhin F.T., Kostorna I.V. Morphological changes in the respiratory system in chronic obstructive pulmonary disease. *Archive of Pathology*. 2016; 78 (1): 42–50. (in Russ.)]. DOI: 10.17116/patol201678142-50.
- Wacleche V.S., Tremblay C.L., Routy J.-P., Ancuta P. The Biology of Monocytes and Dendritic Cells: Contribution to HIV Pathogenesis. *Viruses*. 2018; 10 (2): 65. DOI: 10.3390/v10020065.
- Новицкий В.В., Воронкова О.В., Уразова О.И., Стрелис А.К., Ткаченко С.Б., Серебрякова В.А., Земляная Н.А., Пирогова Н.П., Филинук О.В., Шилько Т.А. К вопросу о патологии иммунитета при туберкулезе легких. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2008; 1: 15–18. [Novitskiy V.V., Voronkova O.V., Urazova O.I., Strelis A.K., Tkachenko S.B., Serebryakova V.A., Zemlyanaya N.A., Pirogova N.P., Filinyuk O.V., Shilko T.A. To the question of the pathology of immunity in pulmonary tuberculosis.

- Pathological Physiology and Experimental Therapy*. 2008; 1: 15–18 (in Russ.).
16. Rojas J., Salazar J., Martnez M.S., Palmar J., Bautista J., Chávez-Castillo M., Gymez A., Bermúdez V. Macrophage Heterogeneity and Plasticity: Impact of Macrophage Biomarkers on Atherosclerosis. *Scientifica*. 2015; 2015: 851252. DOI: 10.1155/2015/851252.
17. Есимова И.Е., Уразова О.И., Новицкий В.В., Хасанова Р.Р., Кошкина А.А., Чурина Е.Г. Причины дисрегуляции иммунного ответа при туберкулезе легких: влияние *M. tuberculosis* на течение иммунного ответа. *Бюллетень сибирской медицины*. 2012; 3: 79–86. [Esimova I.E., Urazova O.I., Novitsky V.V., Hasanova R.R., Koshkina A.A., Churina E.G. Causes of dysregulation of the immune response in pulmonary tuberculosis: the effect of *M. tuberculosis* on the course of the immune response. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2012; 3: 79–86 (in Russ.).]
18. Bjornheden T., Levin M., Evaldsson M., Wiklund O. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall *in vivo*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19: 870–876.
19. Черешнев В.А., Черешнева М.В. Иммунологические механизмы локального воспаления. *Медицинская иммунология*. 2011. 6 (13): 557–568. [Chereshnev V.A., Chereshneva M.V. Immunological mechanisms of local inflammation. *Med. Immunol.* 2011; 6 (13): 557–568 (in Russ.).]
20. Чумакова С.П., Уразова О.И., Шипулин В.М., Новицкий В.В., Хардикова С.А. Цитокины как индукторы постперфузионной системной воспалительной реакции у кардиохирургических больных с различной продолжительностью коронарной патологии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 260–268. [Chumakova S.P., Urazova O.I., Shipulin V.M., Novitsky V.V., Khardikova S.A. Cytokines as inducers of postperfusion systemic inflammatory reaction in cardiosurgical patients with different duration of coronary pathology. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 260–268. (in Russ.).] DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-260-268.
21. Barnes P.J. Chronic obstructive pulmonary disease • 12: New treatments for COPD. *Thorax*. 2003; 58: 803–808. DOI: 10.1136/thorax.58.9.803.
22. Esper R.J. Hypertension arterial mechanics and other issues. *Revista Argentina de Cardiologia*. 2011; 79 (4): 13.
23. Матвеева В.Г., Головкин А.С., Кудрявцев И.В., Григорьев Е.В., Чернова М.Н. Динамика CD14+CD16+ субпопуляций моноцитов при неосложненном системном воспалительном ответе в периоперационном периоде коронарного шунтирования. *Медицинская иммунология*. 2012; 14 (4–5): 391–398. [Matveeva V.G., Golovkin A.S., Kudryavtsev I.V., Grigoriev E.V., Chernova M.N. Dynamics of CD14+CD16+ subpopulations of monocytes in uncomplicated systemic inflammatory response in the perioperative period of coronary shunting. *Medical Immunology*. 2012; 14 (4–5): 391–398 (in Russ.).]

Вклад авторов

Чумакова С.П. – разработка дизайна исследования, анализ литературы, статистическая обработка результатов исследования и их интерпретация, написание и оформление текста рукописи. Винс М.В. – пробоподготовка биоматериала, выполнение метода проточной цитометрии, написание и оформление текста рукописи. Уразова О.И. – материально-техническое обеспечение проведения лабораторных исследований, интерпретация результатов, написание текста рукописи. Азарова Д.А. – взаимодействие с пациентами и здоровыми донорами, пробоподготовка биоматериала, поиск литературы. Шипулин В.М. – консультирование по вопросам планирования исследования и интерпретации результатов. Прякин А.С. – взаимодействие с кардиологическими пациентами, обеспечение клинического материала, поиск литературы. Букреева Е.Б. – обеспечение взаимодействия с пациентами, консультирование по вопросам интерпретации результатов. Буланова А.А. – взаимодействие с пациентами, участие в сборе и подготовке биоматериала, поиск литературы. Кошель А.П. – обеспечение клинического материала, консультирование по вопросам планирования исследования. Гарганеева Н.П. – консультирование по вопросам интерпретации результатов. Чурина Е.Г. – консультирование и интерпретация результатов. Ситникова А.В. – поиск и анализ литературы. Новицкий В.В. – консультирование по вопросам интерпретации результатов, корректировка текста рукописи.

Authors contribution

Chumakova S.P. – design of research, analysis of literature, statistical processing of research results and their interpretation, writing and design of the text of the manuscript. Vins M.V. – Sample preparation of biomaterial, performance of flow cytometry method, writing and design of manuscript text. Urazova O.I. – material and technical support of laboratory studies, interpretation of results, writing the text of the manuscript. Azarova D.A. – interaction with patients and healthy donors, sample preparation of biomaterial, literature search. Shipulin V.M. – advice on research planning and interpretation of results. Pryakhin A.S. – interaction with cardiac patients, provision of clinical material, literature search. Bukreeva E.B. – providing interaction with patients, counseling on the interpretation of results. Bulanova A.A. – interaction with patients, participation in the collection and preparation of biomaterial, literature search. Koshel A.P. – providing clinical material, research planning advice. Churina E.G. – consultation and interpretation of results. Sitnikova A.V. – literature search and analysis. Garganeeva N.P. – advice on the interpretation of results. Novitsky V.V. – counseling on the interpretation of results, the correction of the text of the manuscript.

Сведения об авторах

Чумакова Светлана Петровна, д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-3468-6154.

Винс Мария Васильевна, аспирант, ассистент, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, ТУСУР, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9457-8879.

Азарова Дарья Александровна, соискатель, СибГМУ, г. Томск.

Шипулин Владимир Митрофанович, д-р мед. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, науч. руководитель отделения сердечно-сосудистой хирургии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ РАН; профессор, кафедра госпитальной хирургии с курсом сердечно-сосудистой хирургии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-1956-0692.

Пряхин Андрей Сергеевич, аспирант, отделение сердечно-сосудистой хирургии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ РАН, г. Томск.

Букреева Екатерина Борисовна, д-р мед. наук, профессор, кафедра пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-7699-5492.

Буланова Анна Александровна, канд. мед. наук, ассистент, кафедра пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-2600-1621.

Кошель Андрей Петрович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой хирургии с курсом мобилизационной подготовки и медицины катастроф, СибГМУ, ГКБ № 3 им. Б.И. Альперовича, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-5337-3183.

Чурина Елена Георгиевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра органической химии, НИ ТГУ; вед. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-8509-9921.

Ситникова Анжелика Владимировна, аспирант, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

Гарганеева Наталья Петровна, д-р мед. наук, профессор, кафедра общей врачебной практики и поликлинической терапии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-7353-7154.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, кафедра патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, ТУСУР, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9577-8370.

(✉) **Винс Мария Васильевна**, e-mail: wmw_1991@mail.ru.

Authors information

Chumakova Svetlana P., DM, Professor, Pathophysiology Division, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3468-6154.

Vins Maria V., Post-graduate Student, Assistant, Pathophysiology Division, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Urazova Olga I., DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Pathophysiology Division, SSMU; Professor, Department of Complex Information Security of Computer Systems, TUSUR, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9457-8879.

Azarova Daria A., Post-graduate Student, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Shipulin Vladimir M., DM, Professor, Honored Scientist of Russia, Scientific Head of the Cardiovascular Surgery Department, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC; Professor, Division of Hospital Surgery with a Course of Cardiovascular Surgery, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1956-0692.

Pryakhin Andrey S., Post-graduate Student, Cardiovascular Surgery Department, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation.

Bukreeva Ecatherina B., DM, Professor, Division of Internal Diseases Propaedeutic with the Therapy Course of Pediatric Faculty, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7699-5492.

Bulanova Anna A., PhD, Assistant, Division of Internal Diseases Propaedeutic with the Therapy Course of Pediatric Faculty, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-2600-1621.

Koshel Andrey P., DM, Professor, Head of Surgery Division with Course of Mobilization Preparation and Disaster Medicine, SSMU; Chief Doctor of the Clinical Hospital № 3 named after B.I. Alperovich, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5337-3183.

Churina Elena G., DM, Professor, Pathophysiology Division, SSMU; Professor, Organic Chemistry Department, NR TSU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8509-9921.

Sitnikova Anzhelika V., Post-graduate Student, Pathophysiology Division, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Garganeeva Natalia P., DM, Professor, Division of General Medical Practice and Outpatient Therapy, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7353-7154.

Novitskiy Vyacheslav V., DM, Professor, Academician of RAS, Honored Scientist of Russia, Professor of the Pathophysiology Division, SSMU; Professor, Department of Complex Information Security of Computer Systems, TUSUR, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9577-8370.

(✉) **Vins Maria V.**, e-mail: wmw_1991@mail.ru.

Received 12.10.2018

Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 12.10.2018

Подписана в печать 17.12.2018

Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные клетки *in vitro*

Шевырев Д.В., Блинова Е.А., Козлов В.А.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИ ФКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

РЕЗЮМЕ

Цель – изучение влияния гуморальных факторов гомеостатической пролиферации интерлейкина (IL) 7 и IL-15 на фенотипические и функциональные характеристики Т-регуляторных клеток у здоровых доноров *in vitro*.

Материалы и методы. В исследование были включены 15 условно здоровых доноров. Методом проточной цитометрии проводились фенотипирование, оценка экспрессии FoxP3 и основных функциональных молекул Т-регуляторных клеток (CTLA-4, PD-L1, HLA-D) до и после культивирования с IL-7 и IL-15, а также с анти-CD3-антителами в комбинации с IL-2. Оценивался пролиферативный ответ Т-регуляторных клеток на стимуляцию указанными факторами.

Результаты. Обнаружено, что факторы гомеостатической пролиферации способствуют сохранению фенотипа CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и численному поддержанию Т-регуляторных лимфоцитов в культуре, а также могут положительно влиять на экспрессию таких функциональных молекул, как PD-L1 и HLA-DR. Кроме того показано, что указанные факторы способны вызывать пролиферацию Т-регуляторных клеток в существенно более низкой степени, чем CD4⁺-лимфоцитов.

Заключение. Выявлена способность гомеостатических факторов IL-7 и IL-15 поддерживать фенотип Т-регуляторных клеток и экспрессию функциональных маркеров. По-видимому, это играет важную роль в условиях лимфопении при снижении числа эффекторных лимфоцитов – основных продуцентов IL-2, которому отводится первостепенная роль в гомеостазе Т-регуляторных клеток в норме.

Ключевые слова: Treg, интерлейкин 7, интерлейкин 15, транскрипционный фактор FoxP3, супрессорные молекулы.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Новосибирской области (№ 17-44-540167р_а).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 110 от 11.10.2017).

Для цитирования: Шевырев Д.В., Блинова Е.А., Козлов В.А. Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на t-регуляторные клетки *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 286–293. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-1-286–293](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-286-293).

УДК 616-092.19-092.4:577.27

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-286-293>

The influence of humoral factors of homeostatic proliferation on t-regulatory cells *in vitro*

Shevyrev D.V., Blinova E.A., Kozlov V.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. The aim of this study was the investigation of the influence of humoral factors of homeostatic proliferation IL-7 and IL-15 on T-regulatory cells in healthy donors.

Materials and methods. The study included 15 conditionally healthy donors. Phenotyping and evaluation of expression changes of transcription factor FoxP3 and the main functional molecules on T-regulatory cells such as PD-L1, CTLA-4 and HLA-DR during cultivation under IL-7, IL-15 and anti-CD3 stimulation combined with IL-2 were performed by flow cytometry. Also, we estimated proliferation intensity of T-regulatory cells in the course of cultivation.

Results. We revealed that humoral factors of homeostatic proliferation can effectively support a pool of T-regulatory cells during cultivation by number and phenotype and can maintain expression of important molecules such as PD-L1 and HLA-DR on regulatory T-cell surface. In addition, our study showed that IL-7 and IL-15 can cause relatively low T-regulatory cells proliferation in comparison to CD4⁺-lymphocytes.

Conclusion. The observed ability of homeostatic proliferation factors to maintain T-regulatory cells pool presumably can play an important role in lymphopenic conditions when the number of effector cells is decreased and the insufficiency of interleukin IL-2 is observed, which plays a primary role in the homeostasis of T-regulatory cells in normal conditions.

Key words: T-regulatory cells, interleukin-7, interleukin-15, transcriptional factor FoxP3, suppression molecules.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research and the Novosibirsk Region (No. 17-44-540167r_a).

Conformity with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Protocol No. 110 of 11.10.2017).

For citation: Shevyrev D.V., Blinova E.A., Kozlov V.A. the influence of humoral factors of homeostatic proliferation on t-regulatory cells *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 286–293. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-286-293>.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы значительное внимание исследователей направлено на изучение гомеостатических механизмов, регулирующих деятельность иммунной системы. В течение жизни организм может сталкиваться с различными факторами физической, химической или биологической природы, воздействие которых сопряжено с развитием лимфопении. К таким факторам относятся

инфекционные, аутоиммунные и онкологические заболевания, стрессы, ятрогенные вмешательства, травмы и т.д. Во взрослом состоянии основным компенсаторным механизмом, направленным на восполнение и поддержание постоянного уровня лимфоцитов, является гомеостатическая пролиферация (ГП) – нормальный физиологический процесс, который запускается в условиях лимфопении [1]. При этом выраженность лимфо-

пени определяет число вакантных лимфоцитарных ниш и влияет на интенсивность протекания ГП [2]. Основными факторами, обеспечивающими ГП, являются: контакт Т-клеточного рецептора (TCR) с аутоантигеном в составе главного комплекса гистосовместимости (self-pMHC) и взаимодействие с цитокинами – интерлейкином (IL) 7 и IL-15, уровень которых повышается при лимфопении [3, 4]. Показано, что в зависимости от выраженности и продолжительности лимфопении, ГП может сопровождаться рядом негативных эффектов – снижением разнообразия репертуара TCR, отбором потенциально аутореактивных лимфоцитов, а также конверсией фенотипа наивных Т-лимфоцитов в Т-клетки памяти. В итоге это может приводить к нарушению ауто толерантности и увеличивать вероятность развития аутоиммунных заболеваний [5–8].

Основными клетками, обеспечивающими толерантность к аутоантигенам, являются Т-регуляторные лимфоциты (Treg). Как было отмечено, гомеостаз Treg в значительной степени зависит от IL-2, главными продуцентами которого являются Т-клетки, несущие $\alpha\beta$ -TCR и любой из ко-рецепторов CD4 или CD8. Можно предположить, что лимфопения будет негативно влиять на периферический пул Treg ввиду сокращения компартмента Т-клеток-продуцентов IL-2. Действительно, в нескольких исследованиях *in vivo* показано, что Treg не только теряют функциональную активность, но и могут подвергаться дифференцировке в Th17-лимфоциты в условиях лимфопении, что в обоих случаях сопряжено с депривацией IL-2 [9–11]. Учитывая, что при лимфопении в восстановлении пула Т-лимфоцитов основную роль играют цитокины IL-7 и IL-15, возникает вопрос, каким образом данные гомеостатические факторы влияют на фенотип и экспрессию функциональных маркеров Treg. Имеющиеся в литературе на сегодняшний день данные о воздействии IL-7 и IL-15 на популяцию Treg противоречивы.

Согласно одним данным, IL-7 способен поддерживать стабильную экспрессию FoxP3 в Treg [12, 13], в то время как другие данные указывают на участие данного цитокина в дифференцировке Treg в Th17-клетки, которым отводится важная роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний [14]. В исследованиях *in vivo* показано, что IL-15 может способствовать пролиферации Treg и экспрессии в них транскрипционного фактора FoxP3 и тем самым предотвращать развитие аутоиммунного диабета [15]. Однако при вирусной инфекции IL-15 вызывает противоположные эф-

фекты, обеспечивая устойчивость Т-эффекторных клеток к супрессорному действию Treg [16]. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния гуморальных факторов ГП IL-7 и IL-15 на фенотипические и функциональные характеристики Treg.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужила периферическая кровь, полученная от 15 условно здоровых доноров в возрасте 27–60 лет, средний возраст (47 ± 11) лет. Для выделения фракции мононуклеарных клеток (МНК) использовался метод центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина. Treg-клетки окрашивали антителами фирмы Bio Legend (США): для поверхностных молекул CD3-PE/Cy7, CD4-APC/Cy7, CD25-PE, CD127-PerCP/Cy5.5, внутриклеточных – FoxP3-PE, CD3-FITC, CD4-APC/Cy7, CD25-APC. Оценка экспрессии основных функциональных молекул проводилась с помощью моноклональных антител: PD-L1-APC, CTLA-4-PE/Cy7, HLA-DR-PerCP. Анализ фенотипа осуществлялся на цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Для оценки пролиферативного ответа Treg использовался витальный краситель CFSE, предварительно проводилось выделение чистой популяции Т-регуляторных клеток методом иммуномагнитной сепарации с применением набора MACS Treg Isolation Kit фирмы Miltenyi Biotec (Россия) по фенотипу $CD4^+CD25^+CD127^{dim}$. Чистота магнитной сортировки Treg-клеток составила в среднем ($96 \pm 3,6$)%. Для сохранения жизнеспособности выделенные Т-регуляторные клетки сокультивировали с МНК в соотношении 1 : 1. Культивацию проводили в течение 7 сут в 48- и 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640, дополненной антибиотиками и 10% FCS в присутствии IL-7 (25 нг/мл) и IL-15 (25 нг/мл) производства PeproTech (Великобритания), а также анти-CD3-антител (0,25 мкг/мл), производитель «Сорбент», Россия, и IL-2 (25 МЕ/мл), компания «НПК БИОТЕХ», Россия. Оптимальная концентрация цитокинов, в ответ на которые пролиферировало большее количество $CD3^+CD4^-$ и $CD3^+CD8^+$ -клеток, были подобраны опытным путем. В качестве контроля проводилась культивирование без стимуляции. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica 6.0 с использованием непараметрических методов: Вилкоксона (для зависимых выборок) и Манна – Уитни (для независимых). Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Для описательной статистики так-

же использовались непараметрические методы, вычисляли медиану и интерквартильный размах (25-й и 75-й перцентили) $Me (Q_{25}-Q_{75})$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание $CD25^+FoxP3^+$ -Treg периферической крови среди $CD4^+$ -лимфоцитов у здоровых доноров составило $(6,05 \pm 1,5)\%$. Согласно результатам, представленным на рис. 1, IL-7 способен поддерживать популяцию Treg по числу и фенотипу (экспрессия FoxP3 и CD25) в культуре *in vitro* на уровне, сопоставимом со стимуляцией IL-2 и анти-CD3-антителами. IL-15 также был способен поддерживать Treg в культуре, но достоверно слабее, чем IL-7 ($p = 0,009$), в то время как в контроле без стимуляции доля $CD25^+FoxP3^+$ -лимфоцитов оказалась значительно ниже.

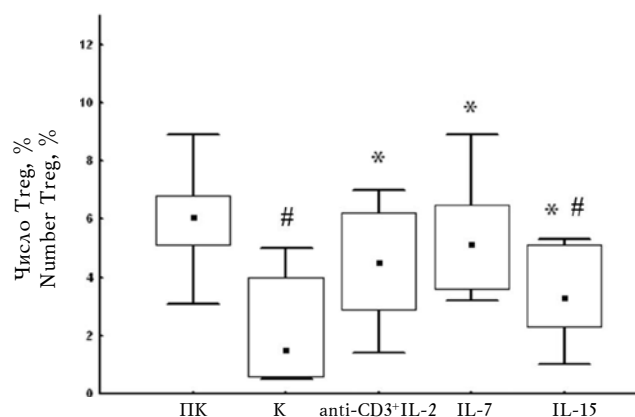


Рис. 1. Т-регуляторные клетки у здоровых доноров до и после культивирования *in vitro*, %, $n = 11$, $Me (Q_{25}-Q_{75})$: ПК – периферическая кровь, К – контроль без стимуляции (здесь и в рис. 2–4). * достоверное отличие ($p < 0,05$) в сравнении с контролем; # достоверное отличие ($p < 0,05$) в сравнении с IL-7

Fig. 1. Treg-cell before and after cultivation, %, $n = 11$, $Me (Q_{25}-Q_{75})$: ПК – peripheral blood, К – control without stimulation (here and in fig. 2–4). *significant difference ($p < 0.05$) in comparison with control, # significant difference ($p < 0.05$) in comparison with IL-7

На следующем этапе было исследовано влияние гуморальных факторов ГП на экспрессию Treg-клетками основных функциональных молекул, таких как CTLA-4 и PD-L1, играющих важную роль в контакт-зависимых супрессорных механизмах. Изучение внутриклеточной экспрессии CTLA-4 не выявило существенных отличий в образцах из периферической крови до стимуляции и после культивирования со стимуляцией и без нее. Доля $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ -лимфоцитов, экспрессирующих CTLA-4, составила $(98,5 \pm 0,5)\%$,

в то время как поверхностная экспрессия данной молекулы достоверно снижалась во всех образцах после культивации и значимо не отличалась в группах контроля и при стимуляции (рис. 2). Изменение экспрессии PD-L1 при культивировании носило другой характер (рис. 3).

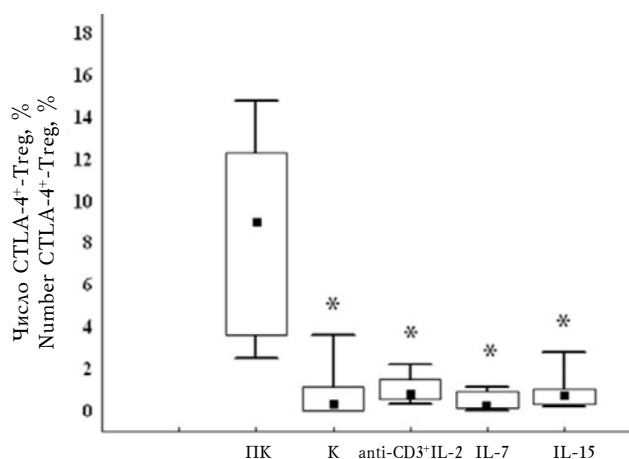


Рис. 2. CTLA-4⁺-T-регуляторные клетки у здоровых доноров до и после культивирования *in vitro*, %, $n = 8$, $Me (Q_{25}-Q_{75})$. * достоверное отличие ($p < 0,05$) в сравнении с периферической кровью

Fig. 2. CTLA-4⁺-Treg-cell before and after cultivation, %, $n = 8$, $Me (Q_{25}-Q_{75})$. *significant difference ($p < 0.05$) in comparison with peripheral blood

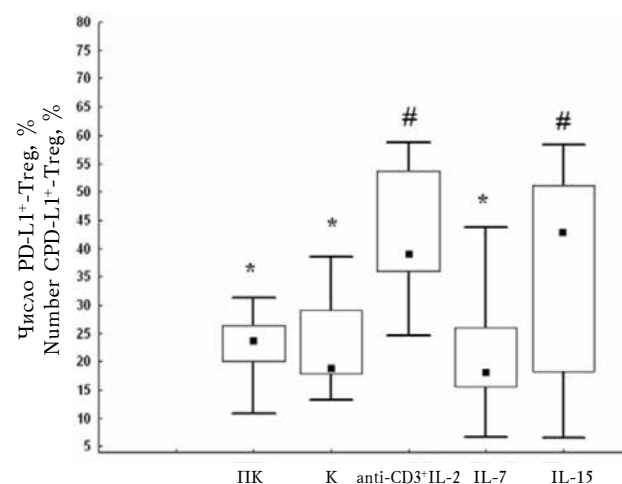


Рис. 3. PD-L1⁺-регуляторные клетки до и после культивирования, %, $n = 8$, $Me (Q_{25}-Q_{75})$. * достоверное отличие ($p < 0,05$) в сравнении с anti-CD3+IL-2 стимуляцией; # достоверное отличие ($p < 0,05$) в сравнении с IL-7

Fig. 3. PD-L1⁺-T-regulatory cell before and after cultivation, %, $n = 8$, $Me (Q_{25}-Q_{75})$. * significant difference ($p < 0.05$) in comparison with anti-CD3+IL-2 stimulation, # significant difference ($p < 0.05$) in comparison with IL-7

Выявлено достоверное увеличение доли Treg, экспрессирующих PD-L1 под влиянием IL-2 и анти-CD3-антител; стимуляция IL-15 в виде тенденции увеличивала процентное соотношение PD-L1⁺-Treg в сравнении с клетками периферической крови ($p = 0,06$). Однако в контроле и IL-7-стимулированных клетках данный параметр не изменялся.

Экспрессия HLA-DR на CD25⁺FoxP3⁺-Treg в периферической крови составил ($21 \pm 2,5$)%. При культивировании без стимуляции доля HLA-DR⁺-Treg-лимфоцитов значительно снижалась, при этом IL-7 лучше остальных факторов обеспечивал сохранение экспрессии HLA-DR *in vitro* (рис. 4).

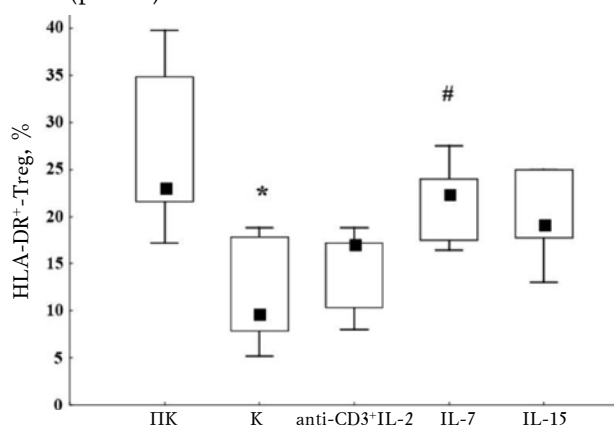


Рис. 4. HLA-DR⁺-T-регуляторные клетки до и после культивирования, %, $n = 5$, $Me (Q_{25}-Q_{75})$. * достоверное отличие ($p < 0,05$) в сравнении с периферической кровью, # достоверное отличие ($p < 0,05$) в сравнении с контролем или стимуляцией anti-CD3⁺IL-2

Fig. 4. HLA-DR⁺-T-regulatory cell before and after cultivation, %, $n = 5$, $Me (Q_{25}-Q_{75})$. * significant difference ($p < 0.05$) in comparison with peripheral blood; # significant difference ($p < 0.05$) in comparison with control or stimulation with anti-CD3⁺IL-2

Обнаружено, что HLA-DR⁺-Treg обладают достоверно более высокой экспрессией FoxP3 в сравнении с HLA-DR-негативными регуляторными клетками. Данное явление наблюдалось также и после культивирования (рис. 5).

На следующем этапе изучалась пролиферация Treg и CD4⁺-эффекторных лимфоцитов под влиянием гуморальных факторов ГП и комбинации анти-CD3-антител с IL-2. Как видно из табл. 1, Treg отвечали на стимуляцию пролиферацией, однако, ее интенсивность была существенно ниже, чем у CD4⁺-эффекторных клеток. Тем не менее как CD4⁺-эффекторные лимфоциты, так и Treg осуществляли в среднем 5–6 детектируемых делений в течение 7 сут.

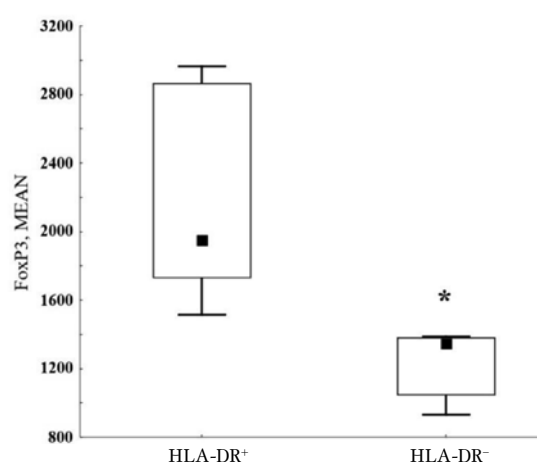


Рис. 5. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) FoxP3 у HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻-T-регуляторных клеток периферической крови, $n = 8$, $Me (Q_{25}-Q_{75})$. * достоверное отличие ($p = 0,007$) HLA-DR⁻-Treg-клеток от HLA-DR⁺

Fig. 5. Mean fluorescence intensity of FoxP3 in HLA-DR⁺ and HLA-DR⁻-T-regulatory cells, $n = 8$, $Me (Q_{25}-Q_{75})$. * significant difference ($p = 0,007$) HLA-DR⁻-T-regulatory cells from HLA-DR⁺

Таблица 1

Table 1

Оценка пролиферации лимфоцитов, доля клеток, вступивших в пролиферацию, %, $Me (Q_{25}-Q_{75})$ Measuring of cell proliferation, percent of proliferating cells, %, $Me (Q_{25}-Q_{75})$				
Субпопуляция Subpopulation	Контроль Control	Anti-CD3 ⁺ IL-2	IL-7	IL-15
Treg	1,05 (1–1,4)	26,4 (16,7–35,4)	7,9 (4,7–11,1)	7,7 (5,9–9,1)
CD4 ⁺	2,6 (1,9–3,1)	82,3 (69,7–95,1)	45,8 (35,3–57,4)	68 (56,4–80,5)

ОБСУЖДЕНИЕ

В норме поддержание пула Treg в организме происходит в основном за счет IL-2, что подтверждается развитием тяжелых аутоиммунных расстройств как у мышей, так и у людей с ге-

нетическим дефицитом IL-2 или с различными дефектами его рецептора IL-2R [17–21]. Установлено, что IL-2 необходим для развития, функционального созревания и выживания Treg [22]. Учитывая, что основными клетками, вырабатыва-

ющими данный цитокин, являются Т-эффектор-ные клетки [23] и размер периферического пула Treg зависит от числа продуцентов IL-2 [24], то выявленная нами *in vitro* способность IL-15 и, в большей степени, IL-7 поддерживать число Treg и экспрессию FoxP3 может быть альтернативным механизмом гомеостаза Treg при лимфопении. В целом это согласуется с большинством литературных данных, которые указывают на свойство цитокинов с общей γ -цепью положительно влиять на гомеостаз Treg, в частности за счет активации сигнального пути STAT5 [25].

Обнаруженное нами снижение числа Treg, экспрессирующих на поверхности CTLA-4, может отражать отсутствие в наших условиях культивации достаточных стимулов для осуществления супрессии через CTLA-4-опосредованный механизм. В то время как отсутствие изменений во внутриклеточной экспрессии данной молекулы указывает на сохранение потенциальной возможности его реализации. Данный механизм хорошо известен и заключается в конкурентном связывании молекул комплекса B7 (CD80/86) на дендритных клетках, что предотвращает активацию эффекторных Т-клеток [26].

Нами впервые было исследовано влияние IL-7, IL-15, а также комбинации анти-CD3-антител с IL-2 на экспрессию PD-L1 Т-регуляторными лимфоцитами. Данная молекула участвует в механизмах контактной супрессии, и, связываясь с PD-1 на Т-эффекторах, может вызывать их анергию или апоптоз [27]. Наблюдаемое увеличение числа PD-L1⁺-Treg при стимуляции анти-CD3 и IL-2, а также IL-15 свидетельствует в пользу увеличения супрессорной активности Treg в данных условиях. Кроме того, показано, что экспрессия PD-L1 на Treg связана с более стабильной экспрессией основного транскрипционного фактора – FoxP3 [28]. Стоит отметить, что обнаруженная закономерность соответствует литературным данным по влиянию цитокинов с общей γ -цепью на экспрессию PD-L1 CD4⁺Т-эффекторными лимфоцитами [29].

При изучении экспрессии HLA-DR на Treg нами показано, что IL-7 лучше других факторов поддерживает экспрессию данной молекулы, кроме того, обнаружено, что HLA-DR⁺Treg обладают более высокой экспрессией FoxP3. Из этого можно предположить, что эти клетки не только имеют активированный статус, но и обладают более высоким супрессорным потенциалом, который может быть связан с контакт-зависимыми механизмами [30].

Наибольший пролиферативный ответ Treg наблюдался при стимуляции анти-CD3-антителами

в комбинации с IL-2, в то время как IL-7 и IL-15 вызывали более низкую и схожую по интенсивности пролиферацию. При этом пролиферативный ответ CD4⁺-эффекторных лимфоцитов был значительно выше. Необходимо отметить, что пролиферация Treg может происходить как через антигензависимые, так и через антигеннезависимые механизмы [31]. Так, стимуляция Treg-клеток антигеном соответствующей специфичности многократно усиливает пролиферацию только специфического Treg-клона данному антигену [32–34]. В то время как антигеннезависимая пролиферация, опосредованная гуморальными факторами, является поликлональной и необходима для поддержания периферического пула Treg. Таким образом, нами была продемонстрирована медленная антигеннезависимая пролиферация Treg-клеток под действием гомеостатических цитокинов IL-7 и IL-15, схожая с процессом гомеостатической пролиферации Т-лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании показано, что гуморальные факторы IL-7 и IL-15 способны сохранять численность и фенотип Treg, а также обеспечивать их пролиферацию. Это представляется важным в контексте состояния лимфопении, когда возникает определенный дефицит продукции IL-2, который в норме необходим для гомеостаза Treg. Однако пролиферация Treg под воздействием факторов гомеостатической пролиферации происходит на более низком уровне, чем пролиферация CD4⁺Т-эффекторов в тех же условиях, что, вероятно, может приводить к запаздыванию восстановления пула Treg-клеток во время гомеостатической пролиферации, и, по-видимому, представляет еще один механизм связи лимфопении с развитием аутоиммунных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Moxham V.F., Karegli J., Phillips R.E., Brown K.L., Tapmeier T.T., Hangartner R., Sacks S.H., Wong W. Homeostatic proliferation of lymphocytes results in augmented memory-like function and accelerated allograft rejection. *J. Immunol.* 2008; Mar. 15; 180 (6): 3910–3918. DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.3910.
2. Bolton H.A., Zhu E., Terry A.M., Guy T.V., Koh W.P., Tan S.Y., Power C.A., Bertolino P., Lahl K., Sparwasser T., Shklovskaya E., Fazekas de St Groth B. Selective Treg reconstitution during lymphopenia normalizes DC costimulation and prevents graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* 2015; 125 (9): 3627–3641. DOI: 10.1172/JCI176031.
3. Miller C.N., Hartigan-O'Connor D.J., Lee M.S., Laidlaw G., Cornelissen I. P., Matloubian M., Coughlin S.R.,

- McDonald D.M., McCune J.M. IL-7 production in murine lymphatic endothelial cells and induction in the setting of peripheral lymphopenia. *Int. Imm.* 2013; 25 (8): 471–483. DOI: 10.1093/intimm/dxt012.
4. Schluns K.S., Rivas S., Stonier S.W., Colpitts S.L., Anthony S.M. Expression of IL-15 is differentially regulated during lymphopenia depending on the method of induction. *The Journal of Immunology*. 2016; May 1, 196 (1 Supplement): 196.15.
 5. Theofilopoulos A.N., Dummer W., Kono D.H. T cell homeostasis and systemic autoimmunity. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001; 108 (3): 335–340. DOI: 10.1172/JCI12173.
 6. Ge Q., Rao V.P., Cho B.K., Eisen H.N., Chen J. Dependence of lymphopenia-induced T cell proliferation on the abundance of peptide/MHC epitopes and strength of their interaction with T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98 (4): 1728–1733. DOI: 10.1073/pnas.98.4.1728.
 7. Kieper W.C., Burghardt J.T., Surh C.D. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J. Immunol.* 2004; 172 (1): 40–44. DOI: 10.4049/jimmunol.172.1.40.
 8. Jones J.L., Thompson S.A.J., Loh P., Davies J.L., Tuohy O.C., Curry A.J., Azzopardi L., Hill-Cawthorne G., Fahey M.T., Compston A., Coles A.J. Human autoimmunity after lymphocyte depletion is caused by homeostatic T-cell proliferation. *PNAS*. 2013, 110 (50): 20200–20205. DOI: 10.1073/pnas.1313654110.
 9. Komatsu N., Okamoto K., Sawa S., Nakashima T., Oh-hora M., Kodama T., Tanaka S., Bluestone J.A., Takayanagi H. Pathogenic conversion of Foxp3+ T-cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat. Med.* 2014; 20 (1): 62–70. DOI: 10.1038/nm.3432.
 10. Duarte J.H., Zelenay S., Bergman M.L., Martins A.C., Demengeot J. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39: 948–955. DOI: 10.1002/eji.200839196.
 11. Chevalier N., Thorburn A.N., Macia L., Tan J., Juglair L., Yagita H., Yu D., Hansbro P.M., Mackay C.R. Inflammation and lymphopenia trigger autoimmunity by suppression of IL-2-controlled regulatory T cell and increase of IL-21-mediated effector T cell expansion. *J. Immunol.* 2014; 193 (10): 4845–4858. DOI: 10.4049/jimmunol.1302966.
 12. Bayer A.L., Lee J.Y., de la Barrera A., Surh C.D., Malek T.R. A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 2008; 181 (1): 225–234.
 13. Simonetta F., Gestermann N., Martinet K.Z., Boniotto M., Tissieres P., Seddon B., Bourgeois C. Interleukin-7 influences FOXP3+CD4+ regulatory T cells peripheral homeostasis. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e36596. DOI: 10.1371/journal.pone.0036596.
 14. Younas M., Hue S., Lacabaratz C., Guguin A., Wiedemann A., Surenaud M., Beq S., Croughs T., Lelièvre J.D., Lévy Y. IL-7 modulates *in vitro* and *in vivo* human memory T regulatory cell functions through the CD39/ATP axis. *J. Immunol.* 2013; Sep. 15; 191 (6): 3161–3168. DOI: 10.4049/jimmunol.1203547.
 15. Xia J., Liu W., Hu B., Tian Z., Yang Y. IL-15 promotes regulatory T cell function and protects against diabetes development in NK-depleted NOD mice. *Clin. Immunol.* 2010; 134 (2): 130–139. DOI: 10.1016/j.clim.2009.09.011.
 16. Ben A.M., Belhadj H.N., Moes N., Buyse S., Abdeladhim M., Louzir H., Cerf-Bensussan N. IL-15 renders conventional lymphocytes resistant to suppressive functions of regulatory T cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Immunol.* 2009, 182 (11): 6763–6770. DOI: 10.4049/jimmunol.0801792.
 17. Suzuki H., Kündig T.M., Furlonger C., Wakeham A., Timms E., Matsuyama T., Schmits R., Simard J.J., Ohashi P.S., Griesser H. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science*. 1995, 268 (5216): 1472–1476.
 18. Malek T.R., Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*. 2010. 33 (2): 153–165. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.08.004.
 19. Chinen T., Kannan A.K., Levine A.G., Fan X., Klein U., Zheng Y., Gasteiger G., Feng Y., Fontenot J.D., Rudensky A.Y. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat. Immunol.* 2016; Nov. 17 (11): 1322–1333. DOI: 10.1038/ni.3540.
 20. Sharfe N., Dadi H.K., Shahar M., Roifman C.M. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94 (7): 3168–3171.
 21. Goudy K., Aydin D., Barzaghi F., Gambineri E., Vignoli M., Ciullini M.S., Doglioni C., Ponzoni M., Cicalese M.P., Assanelli A., Tommasini A., Brigida I., Dellepiane R.M., Martino S., Olek S., Aiuti A., Ciceri F., Roncarolo M.G., Bacchetta R. Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity. *Clin. Immunol.* 2013; Mar. 146 (3): 248–261. DOI: 10.1016/j.clim.2013.01.004.
 22. Jeon P.H., Oh K.I. IL2 is required for functional maturation of regulatory T cells. *Animal Cells and Systems*. 2017, 21 (1): 1–9. DOI: 10.1080/19768354.2016.1272489.
 23. Owen D.L., Mahmud S.A., Vang K.B., Kelly R.M., Blazar B.R., Smith K.A., Farrar M.A. Identification of cellular sources of IL-2 needed for regulatory T cell development and homeostasis. *J. Immunol.* 2018; Jun. 15; 200 (12): 3926–3933. DOI: 10.4049/jimmunol.1800097.
 24. Almeida A.R., Zaragoza B., Freitas A.A. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J. Immunol.* 2006; 177 (1): 192–200.
 25. Vang K.B., Yang J., Mahmud S.A., Burchill M.A., Vegoe A.L., Farrar M.A. Interleukin-2, -7 and -15, but not TSLP, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J. Immunol.* 2008; Sep. 1, 181 (5): 3285–3290.

26. Jain N., Nguyen H., Chambers C., Kang J. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2010; Jan. 26; 107 (4): 1524–1528. DOI: 10.1073/pnas.0910341107.
27. Dai S., Jia R., Zhang X., Fang Q., Huang L. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. *Cell Immunol.* 2014; Jul. 290 (1): 72–79. DOI: 10.1016/j.cellimm.2014.05.006.
28. Francisco L.M., Salinas V.H., Brown K.E., Vanguri V.K., Freeman G.J., Kuchroo V.K., Sharpe A.H. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2009; Dec. 2; 206 (13): 3015–3029. DOI: 10.1084/jem.20090847.
29. Kinter A.L., Godbout E.J., McNally J.P., Sereti I., Roby G.A., O'Shea M.A., Fauci A.S. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J. Immunol.* 2008; Nov. 15, 181 (10): 6738–6746.
30. Baecher-Allan C., Wolf E., Hafler D.A. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J. Immunol.* 2006; Apr. 15; 176 (8): 4622–4631.
31. Zou T., Caton A.J. Dendritic cells induce regulatory T cell proliferation through antigen-dependent and independent interactions. *The Journal of Immunology*. 2010; 185 (5): 2790–2799. DOI: 10.4049/jimmunol.0903740.
32. Zou T., Satake A., Corbo E., Schmidt A.M., Farrar M.A., Maltzman J.S., Kambayashi T. Cutting edge: IL-2 signals determine the degree of TCR signaling necessary to support regulatory T cell proliferation *in vivo*. *J. Immunol.* 2012; 189 (1): 28–32. DOI: 10.4049/jimmunol.1200507.
33. Nishio J., Feuerer M., Wong J., Mathis D., Benoist C. Anti-CD3 therapy permits regulatory T cells to surmount T cell receptor-specified peripheral niche constraints. *J. Exp. Med.* 2010; 207 (9): 1879–1889. DOI: 10.1084/jem.20100205.
34. Walker L.S., Chodos A., Eggena M., Dooks H., Abbas A.K. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 2003; Jul. 21; 198 (2): 249–258.

Сведения об авторах

Шевырев Даниил Вадимович, аспирант, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Блинова Елена Андреевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-3327-3630.

Козлов Владимир Александрович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. лабораторией клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

(✉) Шевырев Даниил Вадимович, e-mail: dr.daniil25@mail.ru.

Authors information

Shevyrev Daniil V., PhD Student, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Blinova Elena A., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3327-3630.

Kozlov Vladimir A., DM, Professor, Academician of RAS, Scientific Supervisor of RIFCI, Head of the Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

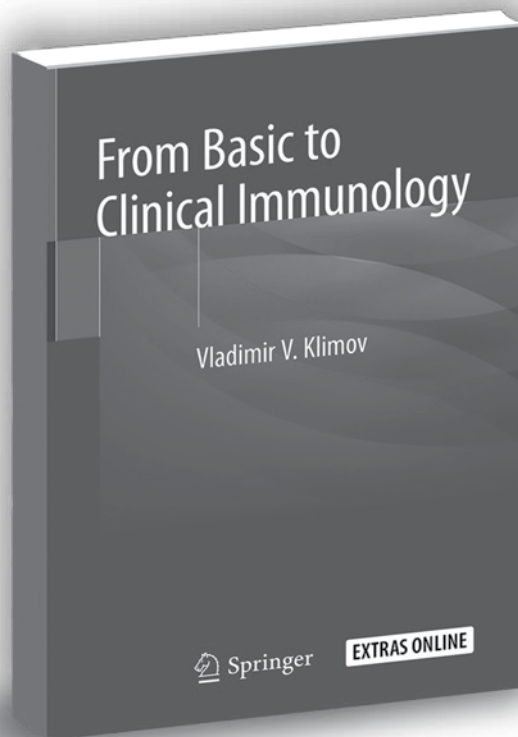
(✉) Shevyrev Daniil V., e-mail: dr.daniil25@mail.ru.

Received 13.11.2018

Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 13.11.2018

Подписана в печать 17.12.2018



В марте 2019 г. издательство Springer выпустило учебник по иммунологии премиум-класса на английском языке (377 стр.), написанный профессором СибГМУ В.В. Климовым. На подготовительном этапе рукопись прошла серьезное международное рецензирование. Этот учебник по иммунологии стал первым в отечественной истории и включен в каталог Библиотеки Конгресса США, о чем свидетельствует присланный автору сертификационный контрольный номер.

В настоящее время учебник в электронном и книжном вариантах продается через систему интернет-магазинов и медицинских книжных магазинов по всему миру.

Предназначен для медицинских студентов и практикующих врачей.

Leading immunologists of the Russian Academy of Sciences on the problems of modern immunology and immunopathology



И.С. Фрейдлин
Член-корреспондент РАН



А.В. Караулов
Академик РАН



В.И. Коненков
Академик РАН



С.А. Недоспасов
Академик РАН



А.С. Симбирцев
Член-корреспондент РАН

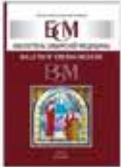


Г.В. Порядин
Член-корреспондент РАН

ISSN PRINT: 1682-0363
ISSN ONLINE: 1819-3684
Бюллетень сибирской медицины
Bulletin of Siberian Medicine
bulletin
ENG | РУС

Бюллетень сибирской медицины
Расширенный поиск

ГЛАВНАЯ О ЖУРНАЛЕ МОЙ КАБИНЕТ ПОИСК СВЕЖИЙ НОМЕР АРХИВ НОВОСТИ АРХИВ 2002-2011



Научно-практический рецензируемый журнал
Научно-практический журнал общепрофессионального профиля «Бюллетень сибирской»

медицины/Bulletin of Siberian Medicine» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты научных исследований, ориентированных на разработку передовых медицинских технологий.

С целью объединения научной медицинской общественности, распространения актуальной информации и содействия профессиональному росту специалистов журнал публикует оригинальные научные статьи, представляющие результаты экспериментальных и клинических исследований, лекции, научные обзоры, отражающие результаты исследований в различных областях медицины. Приоритет для публикации предоставляется материалам по перспективным направлениям современной медицинской науки:

- молекулярная медицина,
- регенеративная медицина и бионженерия,
- информационные технологии в биологии и медицине,
- инвазивные медицинские технологии,
- нейронауки и поведенческая медицина,
- фармакология и инновационная фармацевтика,
- ядерная медицина,
- трансляционная медицина.

Журнал выполняет широкий спектр функций, которые в целом дают представление об основных направлениях развития российской медицинской науки и ее достижениях, ее конкурентоспособности и степени интеграции в международное научное сообщество.

Научно-практический рецензируемый журнал «Бюллетень сибирской медицины / Bulletin of Siberian Medicine» издается Сибирским государственным медицинским университетом с 2001 г. при поддержке ТРОО «Академия доказательной доказательной медицины».

Главный редактор — академик РАН В.В. Новицкий.

Журнал зарегистрирован в Министерстве Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций.

Свидетельство ПИ № 77-7366 от 26.03.2001 г.

ISSN 1682-0363

Журнал включен в Перечень периодических научных и научно-технических изданий, выпускаемых в РФ, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (Перечень ВАК, редакция 01.12.2015).

Индексация:

- РИНЦ (RSCI; Science Index)
- Киберленинка
- DIRECTORY OF OPEN ACCESS JOURNALS
- WoS (ESCI) с 2016 года
- Scopus с 2018 года.

Продолжая традиции первых медицинских журналов, на

Отправить статью

Правила для авторов

Редакционная коллегия

Рецензирование

Этика публикаций

ПОПУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

Содержание модельной дозы ингибитора ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) в плазме крови после физической нагрузки различного характера

Том 16, № 1 (2017)



ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР
Новицкий В.В.

ОБЛАКО ТЕГОВ

адаптация артериальная гипертензия
бронхиальная астма воспаление дети

OPEN ACCESS

Антиплагиат

АНРИ

СОВЕРШЕНСТВО

DOAJ

LIBRARY.RU

CRISIL

Global 50

Google

360

NEICOM

NLM Catalog

Open Access

R

РГБ

Science Index

rnmj.ru

ROAD

Russian Science Citation Index

Scopus

U.S. PUBLICATIONS

U.S. PUBLICATIONS

WorldCat

znanium.com

ISSN 1682-0363 (print)
ISSN 1819-3684 (on-line)
БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ
2019. Т. 18. № 1. 1–294
Подписной индекс 46319